

**Einsatz der Nah – Infrarot (NIR) – Spektroskopie
zur quantitativen Bestimmung
ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

Von Margit Fink
aus Erlangen

1. Referent: Professor P. Winterhalter
2. Referent: Professor U. Engelhardt
eingereicht am: 24.05.2002
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.07.2002
2003
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Tagungsbeiträgen vorab veröffentlicht:

- Fink M.:
NIR-Spektroskopie: Anwendung bei der Quantifizierung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee
Anwendertreffen Bruker Infrarot-Spektroskopie, 03. – 05. November 1998, Karlsruhe
- Fink M., Schulzki G.:
Methodenentwicklung und Validierung der Coffeinbestimmung in entcoffeiniertem Schwarztee mittels NIR-Spektroskopie
4. NIRS-Food-Symposium, 26. Juni 2001, Universität Bonn
- Schulzki G., Fink M.:
NIR-Spektroskopie: Methodenentwicklung und Validierung am Beispiel der Coffeinbestimmung im Schwarztee
Seminar des Zentralinstituts Arzneimittelforschung GmbH, 07. – 08. Dezember 1999, Bad Neuenahr
- Schulzki G., Fink M.:
Methodenentwicklung und Validierung von Gehaltsbestimmungen an entcoffeiniertem Schwarztee mittels NIR-Spektroskopie
Seminar von Concept Heidelberg, 04. Februar 1999, Heidelberg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis Juni 2001 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. P. Winterhalter bei der Fa. PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth durchgeführt.

Bei Herrn Professor Dr. P. Winterhalter bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Dies gewährte mir einen großen Freiraum bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Bei der Fa. PhytoLab danke ich der Geschäftsleitung für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und der finanziellen Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. G. Schulzki für die fachlichen Ratschläge und Diskussionen.

Bei allen Mitarbeitern der Fa. PhytoLab bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme. Insbesondere gilt hier mein Dank der HPLC-Abteilung, allen voran Frau Margit Dienstbier-Haberkamm, bei der Unterstützung der HPLC-Untersuchungen. Danken möchte ich besonders Frau Isabelle Renk, Frau Simone Gußner, Frau Karin Morth und Frau Christina Cassaro, die alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit hautnah miterlebt und immer hilfreich zur Seite standen.

Mein besonderer Dank geht hier an meine Familie, die mir während dieser Zeit mit Rat und Tat und viel Geduld und Verständnis zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön an Frau Daniela Hertel für die Unterstützung bei Problemen mit Formeln, Computern und Druckern und an Frau Astrid Braunschläger und einigen Mitarbeitern der TU Braunschweig für das Korrekturlesen.

Meinen Eltern, Astrid und Marcel gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Schwarzer und Grüner Tee	2
1.1.1	Historie	2
1.1.2	Anbau und Technologie	3
1.1.3	Die Inhaltsstoffe von Grünem und Schwarzem Tee	5
1.1.3.1	Alkaloide	6
1.1.3.2	Flavanole	7
1.1.3.3	Phenolsäuren und Depside	9
1.2	Hibiscusblütendrogen	10
2	Grundlagen der Nah - Infrarot (NIR) - Spektroskopie	13
2.1	Die Geschichte der Nah-Infrarot-Spektroskopie	13
2.2	Physikalisch-chemische Grundlagen	15
2.3	Das Nah-Infrarot-Spektrometer	20
2.3.1	Aufbau und Funktion	20
2.3.2	Die Entstehung eines Interferogramms	22
2.3.3	Die Fourier Transformation	23
2.3.4	Vorteile der FT-Technik gegenüber den konventionellen Geräten	23
2.4	Multivariate Auswertung mittels Partial Least Square Regression	24
2.5	Die Entwicklung einer NIRS - Methode	27
2.6	Die Beurteilung einer NIR-Kalibrierung	31
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Allgemeine Untersuchungen	35
3.1.1	Der Einfluss der Anzahl Scans auf die Quantifizierung	35
3.1.2	Der Einfluss der Partikelgröße	37
3.1.3	Der Einfluss der Packungsdichte der Probe	38
3.2	Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee	42
3.2.1	Überprüfung einer vorhandenen Kalibrierung	42

3.2.2	Die Entwicklung einer neuen Kalibrierung zur Quantifizierung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee	50
3.2.2.1	Die Beurteilung der Güte der Kalibrierung bei Schwarzteeproben mit Coffeingehalten < 0,4 %	54
3.2.2.2	Die Beurteilung der Güte der Kalibrierung bei Schwarzteeproben mit Coffeingehalten < 0,1 %	58
3.3	Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in (nicht entcoffeiniertem) Schwarztee	62
3.4	Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen	66
3.5	Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen	71
3.6	Die Entwicklung der NIR-Kalibrierungen zur Bestimmung ausgewählter Inhaltsstoffe in Grüntee	76
3.6.1	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Catechingehaltes in Grüntee	80
3.6.2	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epicatechingehaltes in Grüntee	85
3.6.3	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epicatechingallatgehaltes (ECG) in Grüntee	88
3.6.4	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epigallocatechingehaltes (EGC) in Grüntee	91
3.6.5	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epigallocatechingallatgehaltes (EGCG) in Grüntee	93
3.6.6	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Theogallingehaltes in Grüntee	96
3.6.7	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Theobromingehaltes in Grüntee	98
3.6.8	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Gallussäuregehaltes in Grüntee	100
3.6.9	NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in Grüntee	103
3.6.10	Zusammenfassung der Gesamtkalibrierungen Grüntee	106

3.6.11	Die Kalibrationen zur Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in entcaffeinierter Grüntee	108
3.6.12	Die Kalibrationen zur Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in nicht entcaffeinierter Grüntee	113
3.6.13	Zusammenfassung der getrennten Kalibrierungen Grüntee	118
4	Material und Methoden	119
4.1	Verwendete Chemikalien	119
4.1.1	Standards für die HPLC-Bestimmungen	119
4.1.2	Sonstige Chemikalien	119
4.2	Verwendete Drogen	119
4.2.1	Hibiscusdrogen	119
4.2.2	Entcaffeinierter Schwarztee	120
4.2.3	Entcaffeinierter Grüntee	120
4.2.4	Schwarz- und Grüntee	120
4.3	Referenzmethoden	121
4.3.1	Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung des Coffeingehaltes in Teedrogen mittels HPLC	121
4.3.2	Quantifizierung von Coffein, Theobromin, Theogallin, Gallussäure und den Catechinen mittels HPLC	123
4.3.3	Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung des Säuregehaltes von Hibiscusblüten mittels Titration	126
4.3.4	Referenzmethode zur Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusblüten mittels UV/VIS-Spektroskopie	126
4.4	NIR-Methoden	127
4.4.1	Allgemeine Daten des NIR-Spektrometers	127
4.4.2	Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Anzahl Scans auf die Quantifizierung	127
4.4.3	Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Partikelgröße	128
4.4.4	Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Packungsdichte der Probe	128

4.4.5	NIR-Methode zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes in entcoffeiniertem Schwarztee	129
4.4.6	NIR-Methode zur Bestimmung des Coffeingehaltes in (nicht entcoffeiniertem) Schwarztee	130
4.4.7	NIR-Methode zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen	130
4.4.8	NIR-Methode zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen	131
4.4.9	NIR-Methode zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grüntee	132
4.4.10	NIR-Methode zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in entcoffeiniertem Grüntee	132
4.4.11	NIR-Methode zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in nicht entcoffeiniertem Grüntee	133
5	Zusammenfassung	134
6	Literaturverzeichnis	139
7	Anhang	145

Abkürzungsverzeichnis

Abseinh.	Absorptionseinheiten
Abl.	Ableitung
const.	konstant
CTC	Crushing - Tearing - Curling
DAB	Deutsches Arzneibuch
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
Entcoff.	Entcoffiniert; auch Eigenname für Kalibrationen
FIR	Fernes Infrarot
FT	Fourier Transformation
FValue	F-Wert
He-Ne-Laser	Helium-Neon-Laser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MIR	Mittleres Infrarot
MLR	Multiple Linear Regression
MSC	Multiple Scatter Correction
MW	Mittelwert
NIR	Nahes Infrarot
NIRS	Nah-Infrarot-Spektroskopie / Nah-Infrarot-Spektrometer
PbS	Bleisulfid
PCR	Principal Component Regression
PLS/PLSR	Partial Least Square Regression
RMSECV	Root Mean Standard Error of Cross Validation
RMSEE	Root Mean Standard Error of Estimation
RMSEP	Root Mean Standard Error of Prediction
s	Standardabweichung
TV	Trocknungsverlust
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
VN	Vektornormierung
VK	Variationskoeffizient

ZNS Zentrales Nervensystem

Symbolverzeichnis

A	Absorption
B	Matrix des Regressionskoeffizienten
χ	Wegdifferenz der Teilstrahlen
conc	Konzentration
c_v	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
d	Schichtdicke
E	Energie
e	Eulersche Zahl
F,G	Residualmatrizen
h	Plancksches Wirkungsquantum
i	Imaginäre Einheit
I	Intensität
κ	Kubelka-Munk-Absorptionskoeffizient
k	Wellenzahl
λ	Wellenlänge
N	Anzahl Proben
ν	Frequenz
π	Kreiszahl
P,Q	Loading-Matrizen
R	Reflexion
R^2	Bestimmtheitsmaß
Res_i	Residuenwert Probe i
R_u	diffuse Reflexion bei unendlicher Schichtdicke
S	Fourier Koeffizient
s_k	Streukoeffizient
$SpecRes_i$	Spektrale Residuen der Probe i
$SpecRes_j$	Spektrale Residuen aller Proben j ohne Probe i
T	Transmission
t	Score-Vektor
T,U	Score-Matrizen
X	Spektraldaten

\bar{x}	Mittelwert der Einzelmessungen
x_i	Einzelmessung bei Mehrfachbestimmung
Y	Konzentrationsdaten
Y_i	Konzentrationswert Probe i
Y_i^{NIR}	NIR-Wert der Probe i
Y_i^{Ref}	Referenzwert der Probe i
Y_m	mittlerer Konzentrationswert

1 Einleitung und Zielsetzung

Im Mittelpunkt der geplanten Untersuchungen steht die Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS). Es soll geprüft werden, inwieweit mittels NIRS auch noch geringe Konzentrationen eines Analyten in einer Pflanzenmatrix bestimmt werden können. Dies soll anhand der Gehaltsbestimmung des Restcoffeingehaltes in entcoffeiniertem Schwarz- und Grüntee untersucht werden. Darüber hinaus soll die Möglichkeit der Erstellung einer möglichst genauen, aber auch robusten Methode zur Quantifizierung von Coffein in nicht entcoffeiniertem Schwarz- und Grüntee sowie von Flavanolen, Gallussäure, Theobromin und Theogallin in Grüntee mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie geprüft werden. Ebenso wird eine Kalibrierung für die Bestimmung der Qualitätsparameter von Hibiscusblüten-Drogen gesucht.

Die Bestimmung mittels NIRS ist verglichen mit HPLC-, photometrischen oder nasschemischen Untersuchungen eine weniger zeit- und arbeitsaufwendige Methode. Durch den Wegfall der Probenvorbereitung bei NIR-Messungen ist der Zeitaufwand geringer und es werden keine Chemikalien verbraucht. Dadurch fallen niedrigere Personal-, Material- und Entsorgungskosten an.

Da die Messung einer Probe weniger als eine Sekunde in Anspruch nimmt, ist ein hoher Probendurchsatz möglich. Hinzu kommt, dass die NIR-Messung eine zerstörungsfreie Analysenmethode darstellt. Die Probe kann somit nach der Messung weiterverwendet werden. Die Bedienung des Nah-Infrarot-Spektrometers ist einfach und das Personal dadurch schnell anlernbar. Der Einsatz der NIR-Methode im Routinebetrieb eines Labors bringt demnach leicht ersichtliche Vorteile mit sich. Der Zeitfaktor ist gerade dann wichtig, wenn, wie zum Beispiel bei der Entcoffeinierung von Tee, ein bestimmter Grenzwert des Restcoffeingehaltes nicht überschritten werden darf. Um bei zu hohen Coffeinwerten noch rechtzeitig in die Produktion eingreifen zu können, muß das Analysenergebnis schnell vorliegen.

Der Nachteil dieser Messtechnik liegt im großen Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Erstellung einer Kalibrierung. Damit verbunden ist natürlich auch ein gewisser Aufwand an Kosten. Zudem muß eine bestehende NIR-Methode regelmäßig überprüft und „gepflegt“ werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, inwieweit Methoden der NIR-Spektroskopie konventionelle Analysenmethoden (HPLC, Photometrie, Titrationen) ersetzen können.

1.1 Schwarzer und Grüner Tee

1.1.1 Historie

Der chinesische Kaiser Sheng-Nung soll bereits um 2700 v. Chr. den Tee entdeckt haben. Beim Abkochen des Trinkwassers für den Kaiser sollen Tee-Blätter in den Kessel gefallen sein, die dem Wasser Farbe, angenehmen Geschmack und eine erfrischende, belebende Wirkung verliehen haben sollen.

Der erste geschichtliche Vermerk über den Anbau und die Herstellung von Tee ist im Teebuch „Ch’a Ching“ um 780 n. Chr. zu finden. Der Tee Genuss war zunächst nur Privilegierten vorbehalten. Erst im 1. Jahrhundert n. Chr. verbreitete sich der Tee in der Bevölkerung Chinas und schließlich im gesamten Fernen Osten. Im 12. Jahrhundert etwa entwickelte sich in Japan aus Elementen des Zen-Buddhismus die Tee-Zeremonie.

Die Teebereitung erfolgte damals auf andere Weise als heute. Die Teeblätter wurden zunächst gedämpft und zerkleinert und anschließend zu sogenannten Teeziegeln gepresst und getrocknet. Teile dieser Ziegel wurden anschließend mit Reis, Ingwer, Salz, Milch und Gewürzen gekocht. Die heute bekannte Technologie und Zubereitungsart des Teeaufbrühens setzte sich erst im 14. Jahrhundert durch.

Die erste Teelieferung gelangte 1610 nach Europa. Der Tee wurde in Europa zunächst als Heilmittel, später aber auch als Genussmittel geschätzt [1]. Der zuerst bekannte Grüne Tee wurde schließlich vom Schwarzen Tee verdrängt. In den letzten Jahren konnte ein Anstieg des Teekonsums in Europa verzeichnet werden. Gerade der Grüne Tee erlebte einen Aufschwung. Einerseits wurde der Grüne Tee in den europäischen Ländern durch die steigende Beliebtheit asiatischer Lebensmittel bekannter, andererseits auch durch die Zunahme der Veröffentlichungen über seine gesundheitsfördernde Wirkung. Diese soll im Folgenden noch näher beleuchtet werden.

1.1.2 Anbau und Technologie

Tee ist nach Wasser das am häufigsten konsumierte Getränk, wobei 80 % auf den Konsum an Schwarztee und 20 % auf den Konsum an Grüntee entfallen: Insgesamt werden jährlich ca. 2,5 t Tee angebaut [2].

Schwarz- und Grüntee werden aus den jungen Blättern des Teestrauches *Camellia sinensis* gewonnen. Die Pflanze gehört zur Familie der Theaceae, die in über 30 Ländern angebaut wird. Die beiden wichtigsten Varietäten sind var. *sinensis* und var. *assamica*. Im Teeanbau werden vorwiegend widerstandsfähige Hybride der beiden Varietäten verwendet. Hauptanbaugebiete des Tees sind Indien, China und Sri Lanka [3].

Camellia sinensis wird auf Strauchhöhe von 1 - 1,5 m zurückgeschnitten, um die Ernte zu erleichtern. Ohne diesen Schnitt würde die Pflanze zu einem Baum von 5 – 15 m Größe heranwachsen. Die immergrüne Pflanze besitzt dunkle, gezahnte, lederartige Blätter und eine unscheinbare weiße bis rosa Blüte. Für hochwertige Tees werden die beiden jüngsten Blätter und die Blattknospe („two leaves and a bud“) geerntet. Je älter die Blätter sind, umso niedriger sind die für die Teequalität wichtigen Gehalte an Polyphenolen und Coffein. Deshalb bedeutet bereits die Verwendung des dritten Blattes eine Qualitätsminderung des Tees. Die Ernte der Teeblätter erfolgt aus Qualitätsgründen per Hand [1].

Bei der Herstellung von schwarzem Tee wird beim ersten Schritt, dem Welken, der Wassergehalt der Teeblätter von etwa 77 % auf 60 % gesenkt, um die Blätter für die weitere Behandlung geschmeidig zu machen. Dabei werden die Blätter meist auf Drahtsiebe geschichtet und erhitzte Luft eingeblasen. Beim orthodoxen Verfahren werden die Blätter beim anschließenden Rollen gleichmäßig gequetscht und zerschnitten. Die Blätter befinden sich dabei in speziellen bodenlosen Metallzylindern, die sich über eine gerippte Metallplatte bewegen.

Beim CTC-Verfahren (crushing – tearing – curling) werden die Blätter in einem Arbeitsschritt zerquetscht, zerrissen und gerollt. Dies geschieht zwischen zwei gegenläufigen Walzen, die mit kleinen Messern oder Dornen besetzt sind. Durch die stärkere Zerkleinerung beim CTC-Verfahren im Gegensatz zum orthodoxen Verfahren wird die Fermentationsdauer um ein bis zwei Stunden verringert und die Ergiebigkeit durch die erhaltenen kleinen Blattgrade erhöht.

Der Schritt des Rollens oder das CTC-Verfahren dienen dazu, den Zellsaft austreten zu lassen, damit dieser mit dem Luft-Sauerstoff in Kontakt treten kann. Im intakten Teeblatt befinden sich die Polyphenole in den Vakuolen der Zellen, während sich die Enzyme in den Chloroplasten aufhalten. Für die enzymatische Oxidation, die bei der anschließenden Fermentation stattfindet, muß diese räumliche Trennung aufgehoben werden [4].

Beim Prozess der Fermentation werden bei 20 – 28° C und 100 % Luftfeuchte innerhalb von 2 – 4 Stunden Aroma- und Farbstoffe gebildet. Durch die enzymatisch katalysierte Oxidation der Polyphenole durch Polyphenoloxidasen und den Folgereaktionen entstehen u. a. Theaflavine und Thearubigene. Auch Aminosäuren, Carotinoide und ungesättigte Fettsäuren werden oxidiert. Der ehemals grüne Tee erhält dadurch eine rötlichbraune Färbung.

Beim anschließenden Trocknen bei ca. 90 °C erhöht sich zunächst die Enzymaktivität und es entstehen weitere typische Aromastoffe. Dabei geht Chlorophyll in Phäophytin über, wodurch der Tee seine schwarze Farbe erhält. Schließlich werden die Enzyme durch die Temperatur inaktiviert und die Teeblätter durch eine Senkung des Wassergehaltes auf etwa 3 – 4 % haltbar gemacht. Beim darauffolgenden Sieben erfolgt die Trennung in verschiedene Blattgrößen [5].

Die Teesorten werden nach ihrem Anbaugebiet, ihrer Blattgröße und ihrem Markennamen eingeteilt und in den Handel gebracht [6]. Auf eine Auflistung der wichtigsten Sorten und Anbaugebiete soll hier verzichtet werden. Es wird auf weiterführende Literatur verwiesen [1].

Das Verfahren zur Herstellung von Grünem Tee verzichtet auf eine Fermentation. Nach der Ernte werden die pflanzeigenen Enzyme beim Dämpfen durch die hohe Temperatur inaktiviert und damit die Oxidation der Inhaltstoffe gehemmt. Da auch das Chlorophyll weitestgehend erhalten bleibt, behält der Tee seine olivgrüne Färbung. Nach dem Dämpfen werden die Blätter gerollt und auf einen Wassergehalt von etwa 5 % getrocknet [6].

Gunpowder und Sencha sind die Haupthandelssorten beim Grünen Tee. Durch Beimischungen von Jasmin-, Rosenblüten, Zugabe von ätherischen Ölen oder Aromastoffen werden aromatisierte Grüntees erhalten. Auch vom Schwarztee werden zahlreiche aromatisierte Sorten angeboten. Insgesamt existieren mehr als eintausend Teesorten, darunter ist seit einiger Zeit auch entcoffeiniertes Tee zu finden.

Coffeinarne Tees werden seit einigen Jahren verstärkt produziert. Ein Teil des entcoffeynierten Tees wird für die Herstellung von Erfrischungsgetränken eingesetzt. Bei der vorliegenden Arbeit wurden entcoffeynierte Grüntees vermessen, die vorwiegend mit überkritischem Kohlenstoffdioxid entcoffeyniert wurden sowie entcoffeynierte Schwarztees, die ausschließlich durch Extraktion mit dem Lösungsmittel Ethylacetat erhalten wurden. Näheres zur Entcoffeynierung siehe in Kapitel 4.

1.1.3 Die Inhaltsstoffe von Grünem und Schwarzem Tee

Die Gehalte der Inhaltsstoffe sind abhängig von der Herkunft, Anbaubedingungen, dem Alter der Teeblätter und der Art der Herstellung.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe von Grün- & Schwarztee (nach Lit. 5)

Inhaltsstoffe in % Trockengewicht	Grüner Tee	Schwarzer Tee
Coffein	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0
Polyphenole, gesamt	25 - 35	~ 30
- Flavanole	17 - 30	~ 10
- Flavonole	3 - 4	~ 5
- Phenolsäuren, Depside	~ 5	~ 4
- Theaflavine	-	0,3 - 1,8
- Thearubigene	-	9 - 19
Aminosäuren	~ 4	~ 4
Organische Säuren	~ 0,5	~ 0,5
Polysaccharide	~ 13	~ 13
Proteine	~ 15	~ 15
Lipide	~ 3	keine Angaben
Flüchtige Stoffe	0,01 - 0,02	0,01

Die unterschiedliche Behandlung der Teeblätter bei der Herstellung von schwarzem und grünem Tee wird in der Verteilung der Inhaltsstoffe deutlich (Tabelle1). Die Flavanolgehalte beim grünen Tee sind höher, da sie durch die fehlende Fermentation erhalten bleiben.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit zur Bestimmung des Gehaltes an Coffein, Flavanolen, Theobromin, Theogallin und Gallussäure mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie untersucht. Daher soll nun näher auf diese Verbindungen eingegangen werden.

1.1.3.1 Alkaloide

Das Alkaloid Coffein übt auf den menschlichen Körper pharmakologische und physiologische Wirkungen aus. Coffein kann, abhängig von der Dosis, als mildes Stimulans des zentralen Nervensystems (ZNS) eingesetzt werden. Die anregende Wirkung dieses Alkaloids beruht darauf, dass die Adenosinrezeptoren im Gehirn durch Coffein blockiert werden und dadurch die entspannende Wirkung von Adenosin verzögert wird. Dadurch erhöht sich die Aktionsphase des Körpers und Herz, Kreislauf, Nieren, Magen und Darm werden stimuliert. Durch den übermäßigen Genuss können jedoch Schlaflosigkeit, Herzklopfen, Nervosität und Konzentrationsschwäche auftreten. Nachteilig ist außerdem die Hemmung der Rückresorption der Mineralstoffe und die Förderung der Flüssigkeitsabgabe über die Nieren.

Die Konzentration von Coffein im Gehirn ist abhängig vom jeweiligen Körpergewicht und der Geschwindigkeit der Coffeinresorption. Diese wiederum hängt von der Magenfüllung und der Geschwindigkeit der Magenentleerung ab. Ebenso ist der Abbau des Coffeins individuell verschieden. Coffein hat im Organismus eine Halbwertszeit von etwa 3 – 5 Stunden. Die letale Dosis liegt bei etwa 10 g für den Menschen [7].

Lässt man den Tee nach dem Aufbrühen nur 2 – 3 Minuten ziehen, so soll er anregend wirken. Nach einer Ziehzeit von 4 – 5 Minuten soll er eine beruhigende Wirkung entfalten. Anregend auf das ZNS wirkt der Tee nach der kurzen Zeit, da das dafür verantwortliche Coffein bereits nach kurzer Zeit in den Aufguss übergegangen ist. Nach 4 – 5 Minuten sind auch die Polyphenole in Lösung gegangen, die eine beruhigende Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt ausüben [6].

Die mildere Wirkung des Tees gegenüber Kaffee kann im geringeren Coffeingehalt eines Teeaufgusses begründet sein. Eine Tasse Tee enthält etwa 27 – 67 mg Coffein, eine Tasse Kaffee hingegen 64 – 176 mg [8]. Mit der gleichen Flüssigkeitsmenge wird mit dem Tee demnach weniger Coffein aufgenommen als mit Kaffee. Untersuchungen an Ratten und Mäusen haben zudem ergeben, dass das Coffein aus Tee langsamer resorbiert wird als aus Kaffee oder Wasser [1]. Deshalb gilt: „Tee regt an, nicht auf!“

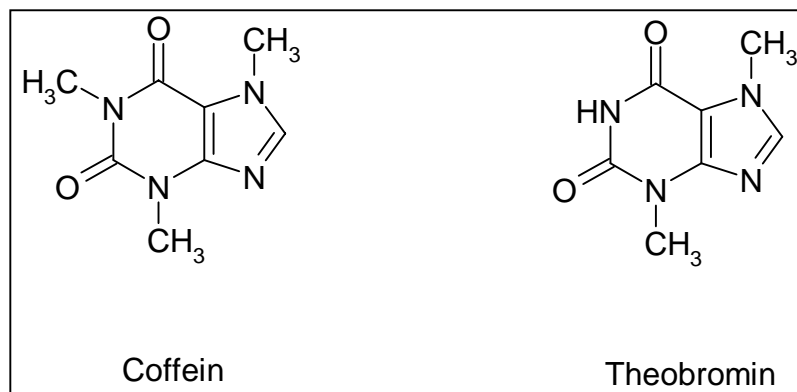
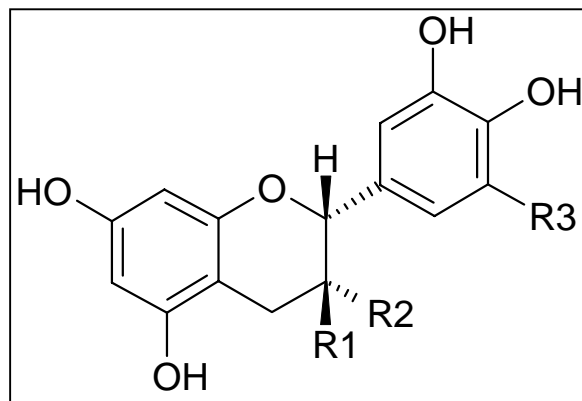


Abb. 1: Strukturformeln von Coffein und Theobromin

Theobromin ist in seiner Wirkung auf den Organismus schwächer als Coffein. Theobromin wird als Diuretikum eingesetzt, zur Anregung des Kreislaufs und bei Durchblutungsstörungen, wobei die anregende Wirkung auf das ZNS fehlt [8].

1.1.3.2 Flavanole

Die Polyphenole in den Teeblättern lassen sich in Proanthocyanidine, phenolische Säuren, Flavanole, Flavone und Flavonole einteilen. Die Flavanole stellen dabei die größte Fraktion dar. Es sind wasserlösliche Substanzen mit einem adstringierenden, bitteren Geschmack.



Flavanol	R1	R2	R3
(+) Catechin	OH	H	H
(-) Epicatechin (EC)	H	OH	H
(-) Epicatechingallat (ECG)	H	GALLOYL	H
(-) Epigallocatechin (EGC)	H	OH	OH
(-) Epigallocatechingallat (EGCG)	H	GALLOYL	OH

Abb.2: Strukturformeln der Flavanole in Tee

Der Gehalt an Polyphenolen im schwarzen Tee hat durch die enzymatische Oxidation und deren Folgereaktionen bei der Herstellung stark abgenommen. Im Grüntee sind sie jedoch fast vollständig erhalten. Im Grüntee fehlen hingegen Theaflavine und Thearubigene, die während der Fermentation und der Trocknung bei der Schwarztee-Herstellung durch Oxidation der Flavanole entstehen. Dadurch ist auch das Aussehen und das Aroma des Teeaufgusses unterschiedlich. Der Grüntee-Aufguss ist gelbgrün und schmeckt leicht bitter, der Aufguss des schwarzen Tees hat jedoch eine gelbrote bis rotbraune Färbung und schmeckt schwach adstringierend. Durch den hohen Gehalt an Polyphenolen, denen eine Vielzahl gesundheitsfördernder Wirkungen zugeschrieben werden, erlebte der Grüntee in den letzten Jahren auch außerhalb der asiatischen Länder einen großen Aufschwung.

Aus einigen Studien, die in den USA und Japan durchgeführt wurden, geht hervor, dass Grün- und Schwarztee in Tierversuchen und ex vivo die Entstehung verschiedener Tumorarten hemmen kann. Epidemiologische Studien liegen bisher jedoch nur für einige Tumorarten vor [9]. So konnten Wang et al. (1992) im Tierversuch feststellen, dass Grüntee-Extrakte die Bildung von Hauttumoren, die durch kanzerogene Chemikalien oder UV-B-Licht initiiert wurden, stark reduzieren konnten [10, 11]. Fujiki und Okida (1992) beschrieben Epigallocatechingallat (EGCG) als wirksamsten antikancerogenen Inhaltsstoff [12].

Die antioxidativen Eigenschaften werden vielfach beschrieben. Polyphenole wirken als Radikalfänger und verhindern so Oxidationen, die zur Zellschädigung führen. Dadurch werden wiederum Reaktionen verhindert, die zur Entartung der Zellen und so zur Entstehung von Tumoren führen können. Besonders starke Radikalfänger stellen das Epigallocatechin (EGC) und das EGCG dar [7]. Die antioxidativen Wirkungen sollen sich ebenso günstig bei atherosklerotischen Prozessen auswirken [13].

Neben der cholesterin- und blutzuckersenkenden Wirkung [7] wurden bei EGCG und ECG bakterio- und virostatistische Wirkungen entdeckt. Dadurch und durch den hohen Fluoridgehalt besitzt Tee einen antikariogenen Effekt [1].

Flavanole wirken allgemein blutdrucksenkend, blutgerinnungshemmend und sollen einen gewissen Schutz bei koronaren Herzerkrankungen bieten [7].

Durch die Chelatbildung mit Metallen kann jedoch die Eisen- und Zinkresorption aus der Nahrung behindert werden [1].

1.1.3.3 Phenolsäuren und Depside

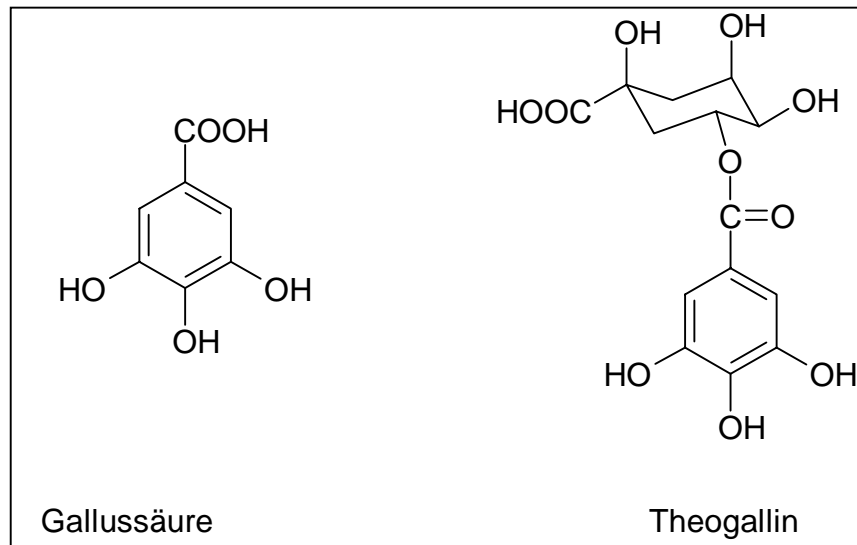


Abb. 3: Strukturformeln von Gallussäure und Theogallin

Im Grüntee liegt die Phenolsäure Gallussäure sowohl frei als auch an Flavanole gebunden vor. Theogallin hingegen ist ein Depsid und ist bisher nur im Tee nachgewiesen worden. Der Gehalt an Theogallin korreliert mit der Qualität eines Tees [5].

1.2 Hibiscusblütendrogen

Bei der Verwendung von Hibiscusblüten werden die getrockneten Kelche und Außenkelche von *Hibiscus sabdariffa* eingesetzt [14]. Die Pflanze gehört zur Familie der Malvaceae und ist in Afrika beheimatet. Heute existiert *Hibiscus sabdariffa* nicht nur im Wildwuchs, sondern wird großflächig im Sudan, im Senegal, in Thailand und China angebaut. Die beste Qualität wird als „El Rahad“ bezeichnet und kommt aus dem Sudan [15].

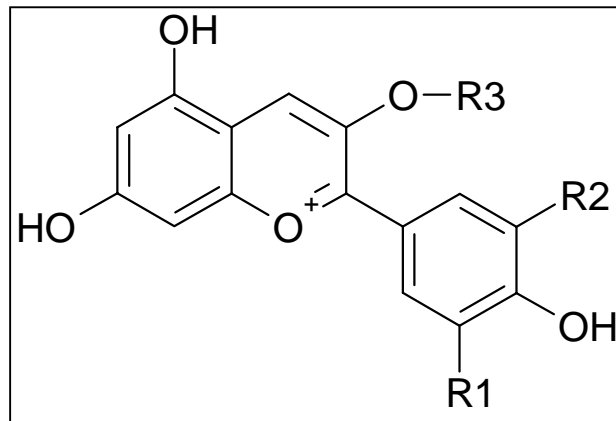
Der Strauch ist eine einjährige Pflanze und wird je nach Beschaffenheit des Bodens 1 – 1,5 m hoch. Die Pflanze ist anspruchslos und gedeiht auch auf dürrtem Sandboden. Die Aussaat erfolgt allerdings während der Regenzeit, da die Pflanze zur Entwicklung viel Wasser benötigt.

Zu Beginn der Blütezeit sind die Blütenkelchblätter eingerollt und grün gefärbt. Während der Samenentwicklung werden sie rot und fleischig und umschließen schließlich die reifen Samenkapseln ganz.

Die Ernte der Blütenkelche erfolgt, wenn die grünen, gelappten Laubblätter zu welken beginnen. Anschließend werden erstere getrocknet und vorwiegend nach Europa exportiert. Die getrockneten Blüten sind hart und spröde und besitzen eine tief dunkelrote Färbung [15].

Die Blütenkelchblätter von *Hibiscus sabdariffa* werden nicht nur als reiner Hibiscustee verwendet. Sie sind in fast allen Früchteteemischungen wegen ihres Färbevermögens und ihres angenehm säuerlich-erfrischenden Geschmacks zu finden. Aus diesen Gründen werden sie auch zur Herstellung von Likören, Limonaden und Erfrischungsgetränken eingesetzt [16].

Für das Färbevermögen sind die wasserlöslichen Anthocyane der Hibiscusblüten verantwortlich. Sie sind zu etwa 1,5 % in den Blütenkelchblättern enthalten. In Abbildung 4 sind die wichtigsten Anthocyane dargestellt.



Anthocyane	R1	R2	R3
Delphinidin-3-O-sambubiosid	OH	OH	Sambubiose
Delphinidin-3-O-glucosid	OH	OH	Glucose
Cyanidin-3-O-sambubiosid	OH	H	Sambubiose
Cyanidin -3-O-glucosid	OH	H	Glucose
Delphinidin	OH	OH	H

Abb. 4: Strukturformeln der Anthocyane in Hibiscusblüten
(Sambubiose = β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-Glucopyranose)

Delphinidin-3-O-sambubiosid wird auch als Hibiscin bezeichnet. Zum Einsatz als Färbemittel in Lebensmitteln sind diese Anthocyane nur bedingt geeignet. Die rote bis rotviolette Färbung ist nur bei niedrigen pH-Werten gegeben. Bei pH-Werten > 4 und bei kohlensäurehaltigen Getränken ist die Farbe nicht stabil [17].

Für den fruchtig-säuerlichen Geschmack sind die organischen Säuren in den Hibiscusblüten verantwortlich. Neben Citronensäure, Äpfelsäure, Weinsäure und Oxalsäure wurde die Hibiscussäure (Lacton der Hydroxy-Citronensäure) nachgewiesen (Abb.5). Die Hibiscussäure wurde bisher nur in Hibiscusblüten gefunden [3].

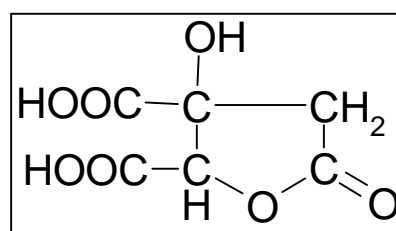


Abb. 5: Hibiscussäure

Schon die Eingeborenen in Afrika bezeichneten die Hibiscusblüten und deren wässrigen Aufguss als Karkadeh, was mit „Trank der Gesundheit bringt“ übersetzt werden kann [15].

Nach Sharaf [18] soll der Hibiscus-Extrakt blutdrucksenkend wirken und das Wachstum von *Mycobakterium tuberculosis* hemmen. Eine Salbe aus dem Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* zeigte antiphlogistische und antiödematöse Wirkungen bei der Behandlung von venösen und arthrotischen Beschwerden [20]. In der afrikanischen Volksmedizin wurden den Blütenblättern antihelminthische, antibakterielle und diuretische Eigenschaften zugeschrieben.

2 Grundlagen der Nah – Infrarot (NIR) – Spektroskopie

2.1 Die Geschichte der Nah-Infrarot-Spektroskopie

Das Prinzip der NIR-Spektroskopie (NIRS) ist seit über hundert Jahren bekannt. NIR-Geräte existieren bereits seit den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts [19]. Die ersten praktischen Anwendungen fand die NIRS in den sechziger Jahren in der landwirtschaftlichen Industrie und in der Lebensmittelchemie. Ben-Gera und Norris entwickelten 1968 eine Methode zur Bestimmung des Wassergehaltes von Sojabohnen [21]. Norris konnte schließlich mit der Nah-Infrarot-Spektroskopie simultan die Gehalte an Wasser, Stärke, Fett und Protein in mehreren landwirtschaftlichen Produkten mittels Reflexionsmessung bestimmen [19].

Mit der Entwicklung leistungsfähiger Computer Ende der achtziger Jahre wurde der Einsatz multivariater Analysenmethoden zur Auswertung der NIR-Spektren möglich und die NIRS fand ein größeres Anwendungsspektrum [22]. Heute existiert bereits eine Vielzahl verschiedener Einsatzgebiete. In der Industrie wird die Nah-Infrarot-Spektroskopie inzwischen in sehr vielen Produktionsanlagen bei der In-Prozesskontrolle eingesetzt, da, durch den Einsatz von Lichtleitern, die Messung bis zu 100 Meter vom Nah-Infrarot-Spektrometer entfernt möglich ist. In der Medizin dient die NIR-Analytik u.a. bereits zur nichtinvasiven Blutzuckermessung [23].

Im pharmazeutischen Bereich wird die NIRS vorwiegend in der Wareneingangskontrolle zur Identifizierung von Rohstoffen genutzt [24], aber auch zur zerstörungsfreien Arzneistoff-Gehaltsbestimmung von Tabletten [19, 25]. Bereits 1997 wurde die NIRS ins Europäische Arzneibuch aufgenommen [26].

Auch in der Lebensmittelchemie gibt es inzwischen viele NIR-Applikationen. Es sollen an dieser Stelle nur einige Beispiele aufgeführt werden. So können Erucasäuregehalte an unzerstörten Rapssaaten bei der Wareneingangskontrolle bestimmt werden [27] oder der Eigelb- und Alkoholgehalt von Eierlikör im Rahmen der Inprozesskontrolle [28]. Die Bestimmung der Inhaltsstoffe von Kartoffeln ist inzwischen ebenso möglich wie der Einsatz der NIRS bei der Bestimmung des etherischen Ölgehaltes und einiger Inhaltsstoffe des Öls von Aromapflanzen und Arzneidrogen [29-34]. Interessant ist hier besonders der Einsatz der NIRS bei sonst analytisch nur schwer zu erfassenden Parametern, wie den sensorischen Eigenschaften von Lebensmitteln. Zur Bestimmung der sensorischen Qualität von Rindfleisch

wurde die NIRS bereits eingesetzt [35]. Von Vorteil ist auch die problemlose Verwendung von Geräten vor Ort, wie es zur Fett- und Proteinbestimmung in zubereiteten Mahlzeiten direkt in den Kantinen bereits erprobt wurde [36]. So hat die Nah-Infrarot-Spektroskopie bereits in vielen Bereichen der Lebensmittelproduktion und der Lebensmittelanalytik Einzug gehalten.

2.2 Physikalisch-chemische Grundlagen

Der Spektralbereich der infraroten Strahlung liegt zwischen dem Bereich des sichtbaren Lichtes und dem Bereich der Mikrowellen und erstreckt sich von 800 nm bis 500 μm (Abb. 6). Dieser Bereich ist unterteilt in das ferne Infrarot (FIR; 50 μm – 500 μm bzw. 200 cm^{-1} – 20 cm^{-1}), das mittlere Infrarot (MIR; 2500 nm – 50 μm bzw. 4000 cm^{-1} – 200 cm^{-1}) und das nahe Infrarot (NIR; 800 nm – 2500 nm bzw. 12500 cm^{-1} – 4000 cm^{-1}).

Wellenzahlen [cm^{-1}]					
10^8	10^7		10^4	10^1	10^{-1}
Röntgenstrahlen	UV	VIS	IR NIR MIR FIR	Mikrowellen	Radiowellen
10^{-10}	10^{-9}		10^{-6}	10^{-3}	10^{-1}
Wellenlängen [m]					

Abb. 6: Lage der NIR- Strahlung im elektromagnetischen Spektrum

Die Spektralbereiche werden meist als Wellenzahlen k mit der Einheit [cm^{-1}] angegeben.

$$k = \frac{1}{\lambda} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Die Wellenzahl k ist der Reziprokwert der Wellenlänge λ und hat den Vorteil, dass sie zur Frequenz der absorbierten Strahlung und damit auch zur Energie direkt proportional ist [19].

$$E = h \cdot \frac{c_v}{\lambda} = h \cdot c_v \cdot k \quad (\text{Gl. 2.2})$$

c_v ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und h ist das Plancksche Wirkungsquantum.

Die Absorptionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Strahlung werden durch Anregung der Elektronen in den Molekülen erhalten. Die NIR-Spektroskopie gehört jedoch ebenso wie die Infrarot-Spektroskopie im MIR-Bereich zu den schwingungsspektroskopischen Methoden. Im Bereich des mittleren und nahen Infrarots werden Molekülschwingungen und im fernen Infrarot Molekülrotationen angeregt.

Bei den Molekülschwingungen unterscheidet man zwischen Valenzschwingungen (Streckschwingungen) und Deformationsschwingungen (Beugeschwingungen).

Die Valenzschwingung ist eine Schwingung in Richtung der Bindungsachse, wobei sich der Abstand der beteiligten Atome zueinander ändert. Bei der Deformationsschwingung ändert sich der Bindungswinkel der beteiligten Atome zueinander [38]. Zur Anregung von Deformationsschwingungen ist eine geringere Energie nötig als zur Anregung von Valenzschwingungen [39].

Da Schwingungen von Atomgruppen in einem Molekül nicht dem Modell des harmonischen Oszillators entsprechen, muß das Modell des nicht harmonischen Oszillators herangezogen werden, um die Entstehung der Molekülschwingungen verständlich zu machen [40].

Bei einer genügend hohen Energie wird die Dissoziationsgrenze erreicht und die Bindung löst sich (Abb. 7).

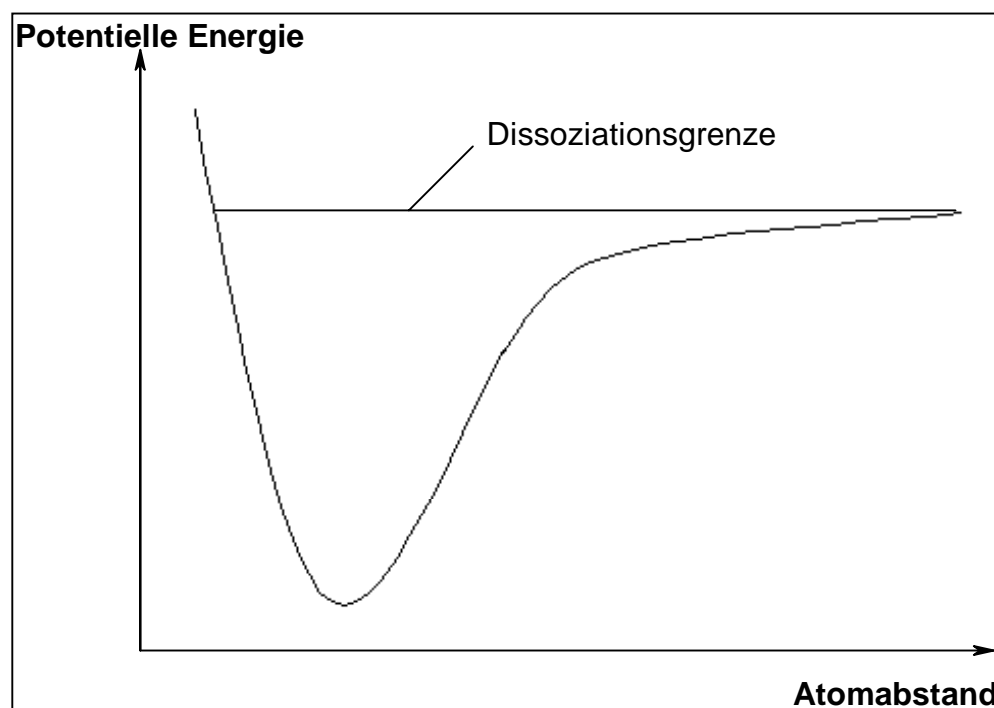


Abbildung 7: Potentialverlauf des nicht harmonischen Oszillators

Nach der Quantentheorie existieren nur diskrete Energiezustände und somit auch nur diskrete Schwingungszustände. Der Übergang vom Grundzustand zum ersten Schwingungsniveau ist die Grundschiwingung. Beim nicht harmonischen Oszillator ist zu beachten, dass auch Übergänge über mehrere Schwingungsniveaus möglich sind, die Oberschwingungen oder Obertöne genannt werden. Die Frequenz der Oberschwingung liegt beim Vielfachen der

Frequenz der Grundschiwingung. Beim Übergang auf das zweite Schwingungsniveau entspricht somit die Frequenz etwa der doppelten Grundschiwingungsfrequenz. Die Übergangswahrscheinlichkeit nimmt mit steigendem Schwingungsniveau ab, wobei auch die Intensität der Absorptionsbanden sinkt [39].

Neben Grund- und Oberschiwingungen treten noch Kombinationsschiwingungen auf, die sich aus mehreren Einzelschiwingungen zusammensetzen. Die Wahrscheinlichkeit für Kombinationsschiwingungen ist noch geringer, weshalb deren Absorptionsbanden noch schwächer ausgeprägt sind als die der Obertöne.

Dadurch ist es im nahen Infrarot möglich, Proben ohne vorherige Extraktion oder Verdünnung direkt zu vermessen [37].

Aus der Schrödinger-Gleichung lässt sich ableiten, dass die Höhe der nötigen Anregungsenergie zunimmt, je stärker die chemische Bindung und je kleiner die schwingende Atommasse ist [40].

Der NIR-Bereich ist der energiereichste Bereich der Infrarotstrahlung. Das bedeutet, dass Absorptionsbanden von leichten Atomen mit einer starken chemischen Bindung im Bereich des nahen Infrarots liegen. Diese Bedingungen sind bei C-H-, O-H- und N-H-Bindungen erfüllt, womit sich die NIRS zur Analyse organischer Verbindungen eignet [41].

Die Grundschiwingungen von C-H-, O-H- und N-H- Bindungen liegen bei 2,5 μm bis 15 μm und damit noch im MIR-Bereich. Die erste Oberschiwingung befindet sich zwischen 1400 nm und 2000 nm und liegt damit wie die höheren Ober- und Kombinationsschiwingungen, die zwischen 800 nm und 1400 nm liegen, im NIR-Bereich [42].

Durch die Vielzahl an Übergangsmöglichkeiten überlappen die einzelnen Absorptionsbanden und man erhält im nahen Infrarot sehr breite Banden [43]. Es gibt keine einzelne Wellenzahl, bei der von einem Substanzgemisch nur eine einzige Komponente absorbiert. Deshalb ist eine quantitative Auswertung anhand einer Wellenzahl unmöglich. Der Einsatz der Chemometrie ist nötig [44].

In der NIRS können Flüssigkeiten unverdünnt vermessen werden. Dies geschieht im Transmissions- - Modus.

Es gilt das Lambert-Beersehe Gesetz:

$$A = \varepsilon \cdot \text{conc} \cdot d \quad (\text{Gl. 2.3})$$

wobei A die Absorption, ε der molare Absorptionskoeffizient, conc die Konzentration und d die Schichtdicke ist. Die Transmission ist mit der Absorption folgendermaßen verknüpft [38]:

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Feststoffe hingegen werden in diffuser Reflexion vermessen. Die Strahlung trifft bei einer pulverförmige Probe auf die zufällig in alle Raumrichtungen verteilten Partikel. Ein Teil der Strahlung wird von der Probe absorbiert und der andere Teil wird von den Teilchen diffus, also ohne Vorzugsrichtung, reflektiert (Abb. 8). Dieser Teil der Strahlung enthält die spektrale Information der Probe und wird detektiert.

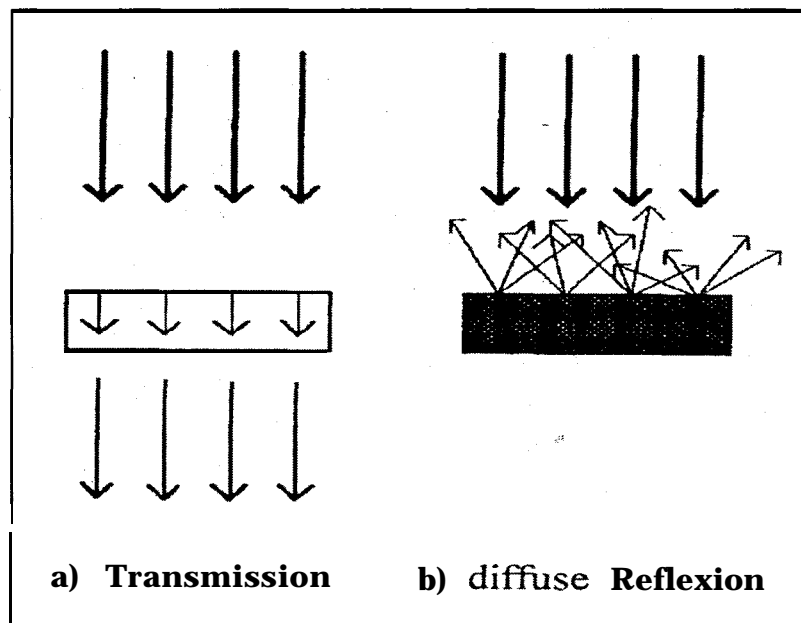


Abbildung 8: Messung flüssiger Proben in Transmission (a) und von Feststoffen in diffuser Reflexion (b), entnommen aus Lit. [19]

Norris hat die von Kubelka und Munk entwickelten Gesetzmäßigkeiten zur diffusen Reflexion weiterentwickelt (vgl. Formel 2.5) [36].

$$\log \frac{R_i}{R} = \log \frac{1}{R} + \log R_i \sim \frac{a' \cdot \text{conc}}{SK} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Die Messung muß hier gegen ein nicht absorbierendes Material, das bei monochromatischem Licht konstante Reflexion zeigt, erfolgen. Nimmt man den Streukoeffizienten und den Absorptionskoeffizienten als konstant an, kann man obige Gleichung vereinfachen [36]:

$$\text{conc} \sim \log \frac{1}{R} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

2.3 Das Nah – Infrarot - Spektrometer

Es gibt verschiedene Techniken zur Erzeugung von NIR-Spektren und dadurch natürlich auch unterschiedliche Spektrometertypen. Neben den dispersiven Spektrometern sind in den letzten Jahren verstärkt Fourier-Transformations-Spektrometer (FT-Geräte) zum Einsatz gekommen. Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen mit einem FT-NIR-Gerät aufgenommen, das mit einem Michelson Interferometer ausgestattet ist. Deshalb soll näher auf das Prinzip der Interferometrie und der Fourier-Transformation eingegangen werden.

FT-Spektrometer unterscheiden sich sehr stark von den dispersiven Geräten. Bei dispersiven Spektrometern wird die NIR-Strahlung in einzelne Wellenlängen getrennt auf die Probe eingestrahlt. Bei FT-Geräten werden hingegen alle Frequenzen des NIR-Spektrums simultan auf die Probe gelenkt und im Detektor erfasst, wodurch ein zeitaufwendiger Wellenlängen-Scan überflüssig wird.

2.3.1 Aufbau und Funktion

Bei vorliegender Arbeit wurde das FT-Nah-Infrarot-Spektrometer Vector 22 NIR der Fa. Bruker Optik, Ettlingen verwendet, bei dem als Strahlungsquelle eine Wolfram-Halogenlampe dient.

Das von der Lichtquelle erzeugte Licht wird durch einen Parabolspiegel parallelisiert und trifft auf das Interferometer. Das Michelson Interferometer besteht aus einem halbdurchlässigen Strahlteiler, einem festen Spiegel (Referenzarm) und einem beweglichen Spiegel (Messarm). Hier erfolgt die Interferenz.

Bei Verlassen des Interferometers wird das Licht durch einen Parabolspiegel auf die Probe fokussiert und die von der Probe diffus reflektierte Strahlung von einem Detektor registriert.

Das monochromatische Licht eines He-Ne-Lasers wird zusätzlich in den Strahlengang des Interferometers gebracht. Das Laserlicht ist parallel zum NIR-Licht orientiert und interferiert simultan. Durch die Interferenzen der monochromatischen Laserstrahlung kann die Spiegelposition des beweglichen Spiegels exakt bestimmt werden.

Beim Vector 22 NIR-Spektrometer können Feststoffe mittels Lichtleitersonde oder der Integrationskugel (Ulbrichtkugel) gemessen werden (Abb. 9) [45]. Die Innenseite der Kugel ist mit einer hochreflektierenden, diffusen Goldbeschichtung versehen und dient bei der Referenzmessung als interner Standard. Über einen umklappbaren Spiegel kann die Strahlung einerseits auf die Innenseite der Kugel zur Leerkanalmessung und andererseits auf die Probe zur Probenmessung gelenkt werden.

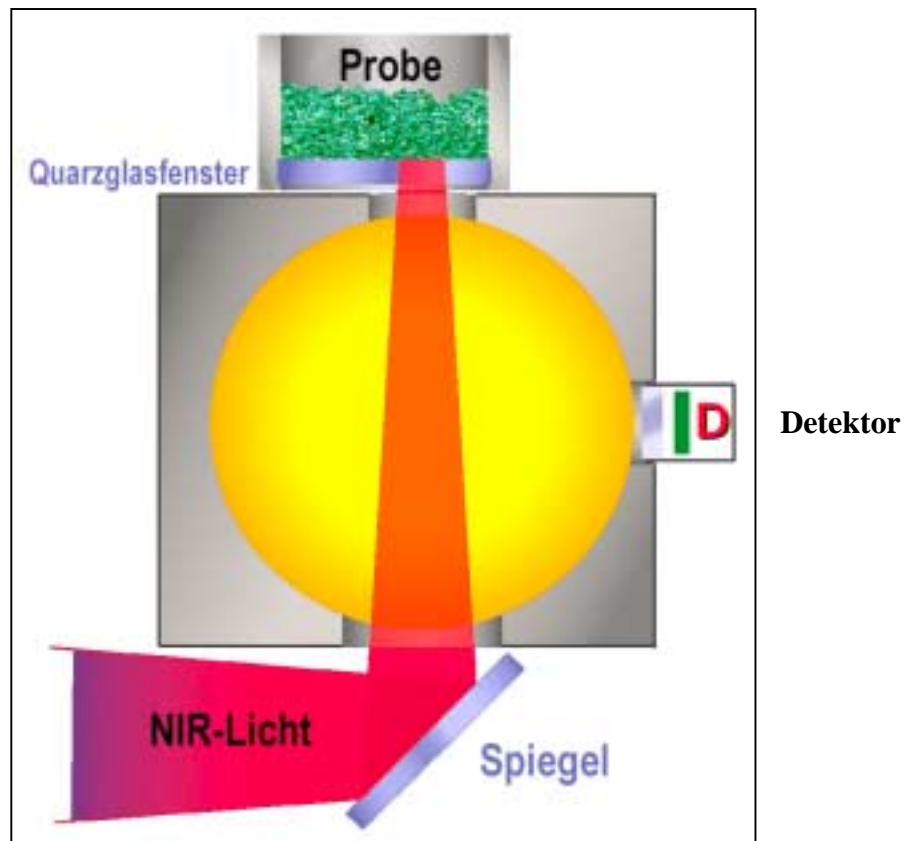


Abb. 9: Strahlengang in der Integrationskugel während der Probenmessung (entnommen von der Homepage www.bruker.de und abgeändert)

Die Probe befindet sich in einem Probenbecher mit Quarzglasboden. Dieser Becher wird durch einen Rotator dezentral gedreht, so dass die NIR-Strahlung, die von unten durch ein Quarzglas-Messfenster auf die Probe trifft, einen großen Teil der Probe erfassen kann. Der Messfleck des NIR-Lichtes hat einen Durchmesser von 20 mm.

Das von der Probe diffus reflektierte Licht wird durch die Integrationskugel gesammelt und vom Detektor gemessen.

Der verwendete PbS-Detektor ist ein Photohalbleiter, dessen Leitfähigkeit sich proportional zur einfallenden Lichtintensität ändert.

Es wird ein Interferogramm erhalten, das durch die Fourier-Transformation in ein Absorptionsspektrum übertragen wird [46].

2.3.2 Die Entstehung eines Interferogramms

Überlagern sich zwei kohärente Wellen, nennt man dies Interferenz. Zwei Wellen sind kohärent, wenn zwischen ihnen eine feste Phasenbeziehung besteht. Wellen von zwei verschiedenen Lichtquellen sind stets inkohärent [47].

Überlagern sich zwei Wellen mit gleicher Wellenlänge, Amplitude und Schwingungsrichtung mit einer Weglängendifferenz von einer halben Wellenlänge oder einem ganzzahligen Vielfachen von $\lambda/2$, so erfolgt Auslöschung. Die Überlagerung ist destruktiv (Abb. 10b).

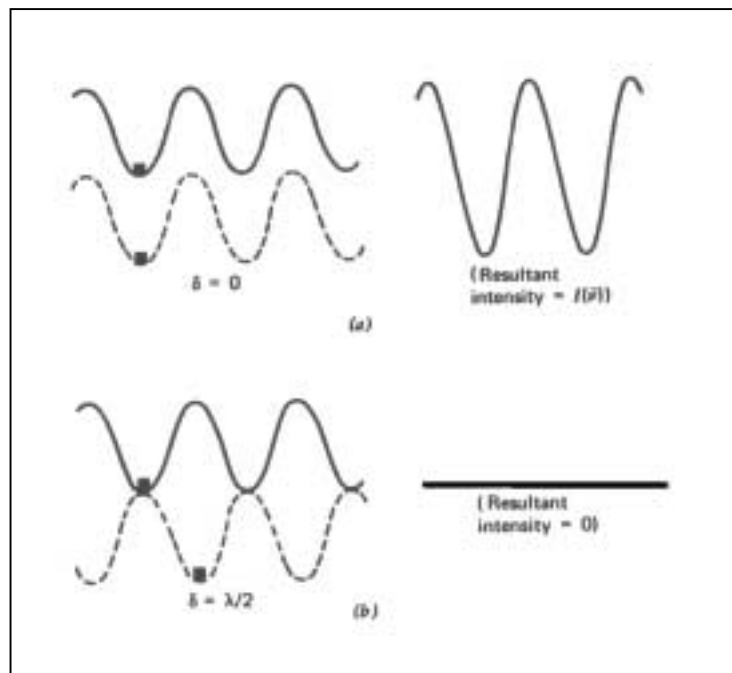


Abbildung 10: Konstruktive (a) und destruktive (b) Überlagerung zweier Wellen [entnommen aus Lit. 46]

Ist die Weglängendifferenz gleich null oder gleich der ganzen Wellenlänge oder einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge, so erfolgt die Überlagerung konstruktiv, sie verstärken sich maximal (Abb. 10a) [46].

Im Interferometer überlagern sich polychromatische Lichtbündel. Das parallele Lichtbündel wird am halbdurchlässigen Strahlteiler in zwei Teilstrahlen aufgespalten. Eine Hälfte wird am Strahlteiler zum Referenzarm reflektiert, die andere Hälfte transmittiert zum Messarm. Die beiden kohärenten Teilstrahlen werden an den jeweiligen Spiegeln reflektiert und am

Strahlteiler vereinigt. Entsprechend der Position des beweglichen Spiegels besitzen die beiden Teilstrahlen eine Wegdifferenz. Abhängig von dieser Wegdifferenz überlagern sich die zwei kohärenten interferierenden Wellenzüge destruktiv oder konstruktiv.

Diese Interferenz entsteht für jede einzelne Wellenlänge bei polychromatischem Licht im Interferometer. Entsprechend überlagern sich die einzelnen Wellenlängen und man erhält das Interferogramm, das die Intensität des Lichts als Funktion des Spiegelweges darstellt [48,49].

2.3.3 Die Fourier Transformation

Die Fourier Transformation ist eine mathematische Operation, die eine Funktion in der Zeitdomäne in eine Funktion in der Frequenzdomäne überführt.

$$I(\chi) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) \cdot e^{-i2\pi\nu\chi} d\nu \quad (\text{Gl 2.7})$$

Die Intensität der NIR-Strahlung wird vom Detektor in Abhängigkeit der Auslenkung des beweglichen Spiegels als Interferogramm registriert. Zur Kontrolle der Position des Spiegels wird das Interferenzmuster des He-Ne-Lasers verwendet. Das Interferogramm wird genau an den Nulldurchgängen des Laser-Interferogramms digitalisiert und anschließend durch die Fourier-Transformation in ein Absorptions-Wellenzahl-Spektrum umgerechnet [19, 49-51].

2.3.4 Vorteile der FT-Technik gegenüber den konventionellen Geräten

Durch die FT-Technik wird der gesamte Frequenzbereich simultan eingestrahlt und am Detektor erfasst. Daher ist das Detektorrauschen eine Größenordnung kleiner als bei dispersiven Geräten, bei denen nur ein kleiner Teil der Messstrahlung auf den Detektor trifft (Multiplex-Vorteil).

Durch die kreisförmigen Aperturblenden ergibt sich ein höherer Strahlungsdurchsatz als durch die Spaltblenden eines Gitterspektrometers und dadurch verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis im Gegensatz zu dispersiven Geräten (Jacquinot-Vorteil).

Die spektrale Auflösung ist abhängig von der Länge des Spiegelhubs des Interferometers. Eine Erhöhung der Auflösung führt hier nicht zur weiteren Ausblendung des Messlichts wie bei vergleichbaren Gitter-Spektrometern. Deshalb kann mit einer hohen Auflösung gemessen werden, ohne dass sich das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert.

Die Messzeit ist hier die Zeit, die der bewegliche Spiegel im Interferometer benötigt, um den Weg zurückzulegen, der für die entsprechende Auflösung nötig ist. Bei einer Auflösung von 2 cm^{-1} beträgt dieser Spiegelweg 0,5 cm. Da der Spiegel sehr schnell bewegt wird, reduziert sich die Messzeit pro Messung auf weniger als eine Sekunde.

Durch Einsatz des monochromatischen Lichts eines Lasers zur Spiegelpositionskontrolle wird eine hohe Wellenlängenpräzision erreicht (Connes-Vorteil). Die Wellenlängengenauigkeit beträgt $< 0,01\text{ nm}$.

Der Nachteil der Fourier-Transformations-Spektrometer war bisher der große Zeitaufwand der Computerberechnungen. Durch die Entwicklung leistungsfähiger Rechner ist der Zeitaufwand jedoch erheblich gesunken und stellt heute keinen limitierenden Faktor mehr dar [50-52].

2.4 Multivariate Auswertung mittels Partial Least Square Regression

Bei der quantitativen Nah-Infrarot-Spektroskopie werden Spektren von Proben mit bekannter Analytkonzentration gemessen. Die Aufgabe der Kalibrierung ist es, aus den Spektraldaten und den Konzentrationsdaten eine mathematische Verknüpfung zu erstellen, mit deren Hilfe die Konzentrationen unbekannter Proben anhand ihrer Spektraldaten vorhergesagt werden können. Wichtig ist dabei natürlich eine möglichst hohe Güte der Vorhersage.

Bei der NIRS ist eine univariate Auswertung anhand einer Wellenzahl ungünstig, da sich viele einzelne Absorptionsbanden zu wenigen sehr breiten Banden überlagern (vgl. Kap. 2.2). Daher muß auf multivariate Analysenmethoden zurückgegriffen werden.

Es existieren verschiedene multivariate Analysenmethoden. Näheres zu den einzelnen Verfahren siehe Literatur [53].

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Partial Least Square Regression (PLS oder PLSR) eingesetzt, da dieser Algorithmus im Gegensatz zur Multiple Linear Regression (MLR) und

der Principal Component Regression (PCR) einige Vorteile bei der quantitativen Auswertung von NIR-Daten bietet.

Die PLSR ist wie die PCR ein faktoranalytisches Verfahren und verknüpft die Veränderungen der Spektraldaten mit den Veränderungen der Konzentrationsdaten. Im Gegensatz zur PCR werden hier aber auch die Konzentrationsdaten bei der Faktorisierung verwendet. Damit stehen bei Verwendung weniger Faktoren mehr Informationen zur Verfügung. Der entscheidende Vorteil der PLS gegenüber der MLR besteht darin, dass die PLSR auch bei Multikollinearität der Variablen eingesetzt werden kann, da aus einer Vielzahl korrelierter Variablen wenige unkorrelierte Variablen berechnet werden [54].

Zuerst werden die Datensätze der Spektren (X) und der Referenzanalytik (Y) mathematisch dargestellt, indem sie als Datenpunktmatrix geschrieben werden.

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} X_1^1 \cdot X_2^1 \cdot X_3^1 \cdots X_n^1 \\ X_1^2 \cdot X_2^2 \cdot X_3^2 \cdots X_n^2 \\ X_1^3 \cdot X_2^3 \cdot X_3^3 \cdots X_n^3 \\ \vdots \\ X_1^m \cdot X_2^m \cdot X_3^m \cdots X_n^m \end{pmatrix} \quad \mathbf{Y} = \begin{pmatrix} y_1^1 \cdot y_2^1 \cdot y_3^1 \cdots y_n^1 \\ y_1^2 \cdot y_2^2 \cdot y_3^2 \cdots y_n^2 \\ y_1^3 \cdot y_2^3 \cdot y_3^3 \cdots y_n^3 \\ \vdots \\ y_1^m \cdot y_2^m \cdot y_3^m \cdots y_n^m \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Die Datenpunktmatrizen werden in ihre Eigenvektoren (Faktoren, Hauptkomponenten) zerlegt. Die Faktoren enthalten alle relevanten spektralen Informationen in komprimierter Form [55].

$$\text{Spektraldaten:} \quad \mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P} + \mathbf{F} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

$$\text{Konzentrationsdaten:} \quad \mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{Q} + \mathbf{G} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

T,U = Score – Matrizen

P,Q = Loading – Matrizen

F,G = Residualmatrizen

Die Faktoren werden nach sinkendem Eigenwert sortiert. Der erste Faktor entspricht somit der Hauptveränderung der Spektraldaten. Mit steigender Faktorenzahl erhöht sich der Anteil an spektralem Rauschen. Es gilt, die optimale Anzahl an Faktoren auszuwählen. Verwendet man zu wenige Faktoren beim Kalibrationsmodell, werden die spektralen Strukturen nur

ungenügend erkannt („Underfitting“). Wählt man zu viele Faktoren, wird dies als „Overfitting“ bezeichnet. Das Modell ist „überbestimmt“, da zu viele störende Anteile des spektralen Rauschens enthalten sind.

Die beiden Gleichungen 2.9 und 2.10 sind durch die „innere Relation“ (Gl. 2.11) miteinander verknüpft [56].

$$U = B T \quad (\text{Gl. 2.11})$$

B = Matrix des Regressionskoeffizienten

Mit der ermittelten Kalibrierfunktion können neue Proben analysiert werden. Der Score-Vektor $t_{\text{unbekannt}}$ des neuen Spektrums x wird durch die Loading-Vektoren P ermittelt.

$$t_{\text{unbekannt}} = x P \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Über die Beziehung $U = B T$ sind die Score-Vektoren der X-Matrix mit den Score-Vektoren der Y-Matrix verknüpft, und dadurch kann der Konzentrationswert $Y_{\text{unbekannt}}$ der neuen Probe aus Gleichung 2.13

$$Y_{\text{unbekannt}} = T B Q \quad (\text{Gl. 2.13})$$

bestimmt werden [54].

2.5 Die Entwicklung einer NIRS-Methode

Bei der Entwicklung einer NIRS-Methode werden zunächst die Proben mit dem Spektrometer vermessen und durch die Referenzmethode die Analytgehalte ermittelt. Daran schließt sich die Kalibrationsentwicklung an (siehe Abb. 11). Durch die Auswahl geeigneter Frequenzbereiche und Datenvorbehandlungen soll durch den PLS-Algorithmus eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen den Referenzdaten (Analytgehalte der Referenzmethode) und den Spektraldaten erhalten werden.

Die Qualität der Korrelation wird durch einige statistische Größen beschrieben (siehe Kapitel 2.6). Erreichen die entsprechenden Werte die vorher festgelegten Anforderungen, kann die Kalibrierung zur Analyse neuer Proben eingesetzt werden.

Vor der Entwicklung einer Kalibrierung zur Quantifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen muß bedacht werden, dass die inhaltsstoffliche Zusammensetzung von Pflanzen und damit auch die Proben natürlichen Schwankungen unterworfen sind. Abhängig von Bodenverhältnissen, Klimabedingungen, Anbauorten und Erntezeitpunkten ändert sich die Beschaffenheit einer Pflanze. Da bei der NIR-Messung nicht eine definierte Bande zur Quantifizierung herangezogen werden kann, sondern meist das gesamte Spektrum (oder zumindest große Teile davon), fließt die spektrale Information aller absorbierenden Bestandteile in die Kalibrierung ein. Es gilt nun, ein Modell zu erstellen, in dem die ganze Variabilität der Pflanzen berücksichtigt wird, damit die Methode in der Praxis verwendet werden kann. Das bedeutet, dass mehrere hundert Proben für eine „robuste“ Methode benötigt werden. Je mehr Proben in der Kalibrierung enthalten sind, desto wahrscheinlicher wird es, dass der Methode zukünftige Veränderungen der Matrix bekannt sind. Diesem Anspruch stehen Kosten und Aufwand entgegen. Es muß eine geeignete Anzahl Kalibrierproben festgelegt werden, die beiden Anforderungen gerecht wird.

Der Konzentrationsbereich der Kalibrierung sollte größer sein als der Bereich der später zu analysierenden Proben. Dieser gewählte Konzentrationsbereich soll außerdem durch die Kalibrationsproben homogen abgedeckt sein (siehe dazu S. 44).

Die homogene Abdeckung des Bereiches ist bei der Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen kein Problem, wohl aber die Variation der Analytgehalte. Hier kann nicht, wie bei synthetischen Produkten, durch Substratzugabe der Konzentrationsgehalt erhöht werden, ohne

die Matrix zu verändern. Es müssen in der Kalibrierung genau die Proben einfließen, die später auch in der Routineanalytik zu analysieren sind (vgl. dazu Kap. 3.2).

Die Referenzmethode, die zur Bestimmung der Konzentrationsdaten dient, muß sorgfältig ausgewählt werden, da die NIR-Methode mit den Referenzwerten die Fehler der Referenzanalytik übernimmt. Deshalb sollte die Referenzmethode die Konzentrationsdaten mit einem hohen Maß an Präzision und Richtigkeit bestimmen.

Vor dem Vermessen der Kalibrierproben mit dem NIRS muß festgelegt werden, welche Probenvorbereitung stattfinden soll. Es muss auch festgelegt werden, welches Messzubehör (Sonde, Integrationskugel) und welche Messbedingungen bei der Routineanalytik später sinnvoll sind (siehe Abb. 11). Die Kalibrierung gilt schließlich nur für Analysen, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden.

Sind diese Bedingungen festgelegt, kann durch Auswahl bestimmter Frequenzfenster und Datenvorbehandlungen ein Modell erstellt werden. Meist ist es sinnvoll, nicht das gesamte Spektrum bei der Auswertung zu betrachten. Durch Ausschluß der Wasserbande wird der Einfluss des Wassergehaltes der Proben auf die NIR-Bestimmung geringer. Soll der Gehalt einer bestimmten Substanz bestimmt werden, können die NIR-Absorptionsbanden des Spektrums der Reinsubstanz zur Auswahl der optimalen Frequenzbereiche herangezogen werden.

Durch geeignete Datenvorbehandlungen können schließlich einige Effekte, wie z.B. Basislinienverschiebungen der Spektren, minimiert werden.

Zur Datenvorbehandlung stehen in der Software einige Möglichkeiten zur Verfügung.

Bei Verwendung der Vektornormierung, der Min-Max-Normierung und der MSC werden bei Messungen von Feststoffen in diffuser Reflexion die Einflüsse, die durch die unterschiedliche Packungsdichte der Proben und der verschiedenen Orientierungen der Partikel entstehen, minimiert.

Die Vektornormierung zentriert die Spektren bei $y = 0$, indem der Mittelwert der y -Werte von den Spektren subtrahiert wird. Anschließend werden die Spektren durch die Wurzel aus der Summe der Quadrate der y -Werte dividiert. Die Vektornorm der Ergebnisspektren ist dabei stets eins.

Bei der Min-Max-Normierung werden die Spektren in y-Richtung so verschoben, bis der kleinste y-Wert y_{\min} bei $y = 0$ liegt. Anschließend werden die Spektren in y-Richtung expandiert bis der größte y-Wert y_{\max} bei $y = 2$ liegt.

Die MSC berechnet aus den Kalibrierspektren den Mittelwert und führt mit den Spektren eine lineare Transformation durch.

Bei der Subtraktion einer Geraden wird von jedem Spektrum eine Gerade subtrahiert, die nach dem Modell der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt wurde, um lineare Basislinienverschiebungen zu eliminieren. Bei der Subtraktion eines konstanten Offsets werden die Spektren linear verschoben, bis y_{\min} bei $y = 0$ liegt.

Durch die Verwendung der ersten Ableitung als Datenvorbehandlung können kleine Signale mit einem steilen Anstieg besser von flachen, breiten Banden abgehoben werden. Mit der zweiten Ableitung lassen sich sehr flache Banden auswerten, wobei das spektrale Rauschen aber an Einfluss gewinnt und damit die Auswertung stark einschränkt [55, 57].

Die Datenvorbehandlung, die für das jeweilige Modell optimal ist, kann automatisch durch die Software berechnet werden. Dabei wird für jede Datenvorbehandlung ein Modell berechnet. Die Kalibration mit dem geringsten Vorhersagefehler RMSECV bei Verwendung möglichst weniger Ranks wird als optimal angezeigt. Nach Festlegung der Frequenzbereiche, der Datenvorbehandlung, der Anzahl Ranks (siehe Kapitel 2.4) und Aufteilung der Proben in das Kalibrierset und das Testset wird die Kalibrierfunktion (siehe Abb. 11) mit den festgelegten Parametern berechnet. Zur Beurteilung der Methode siehe nachfolgendes Kapitel.

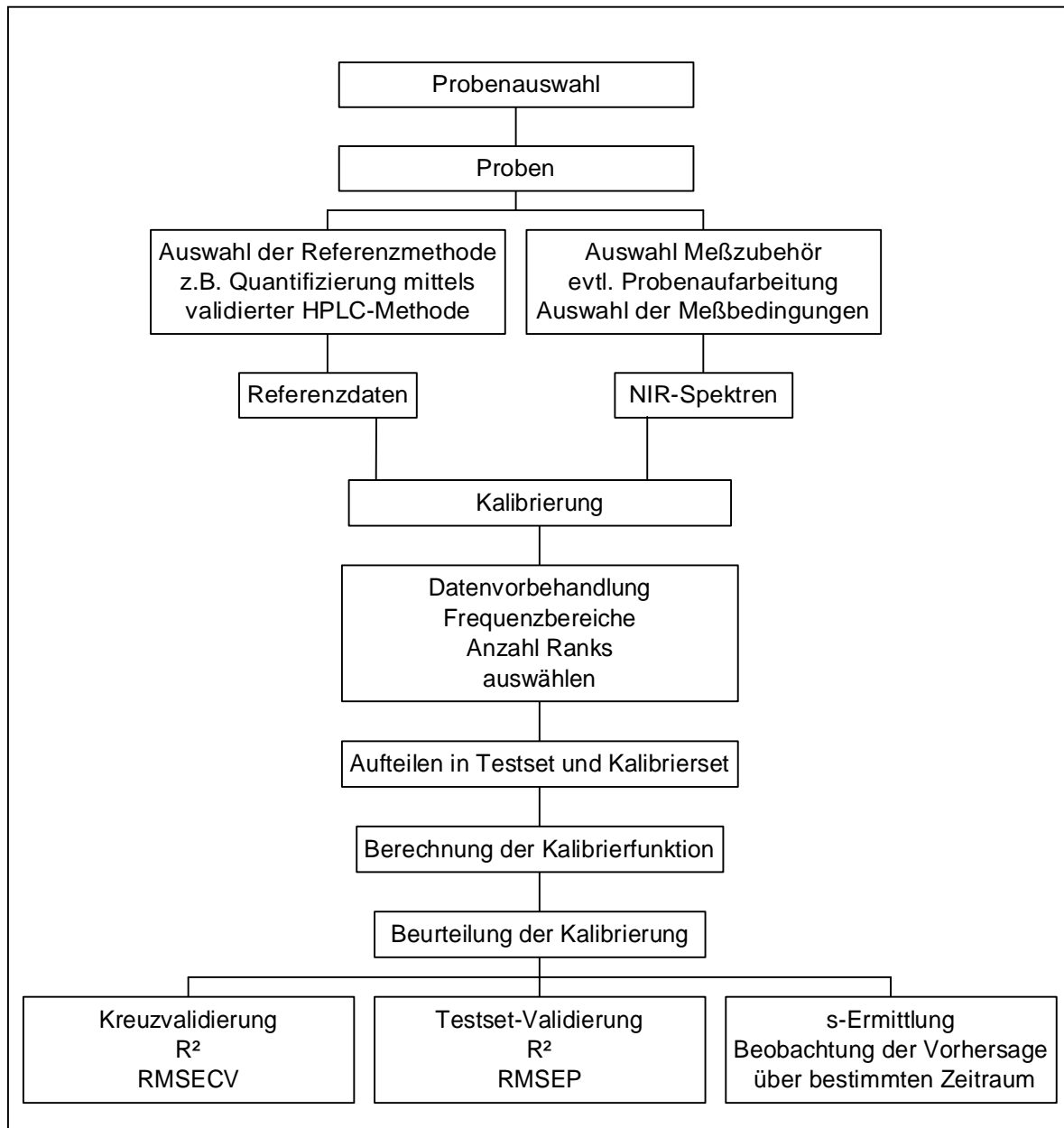


Abbildung11: Erstellung einer Kalibrierung

2.6 Die Beurteilung einer NIR - Kalibrierung

Zur Beurteilung einer Kalibrierung können verschiedene Daten betrachtet werden. Der Bestimmungskoeffizient R^2 einer Methode zeigt die Korrelation zwischen der Varianz der Spektral- und der Konzentrationsdaten.

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^M (\text{Res}_i)^2}{\sum_{i=1}^M (Y_i - Y_m)^2} \right] \cdot 100 \quad (\text{Gl. 2.14})$$

M = Anzahl der Proben Res_i = Residuenwert der Probe i

Y_m = mittlerer Konzentrationswert Y_i = Konzentrationswert der Probe i

Bei Reflexionsmessungen von Feststoffen besteht eine gute Korrelation zwischen den beiden Datensätzen, wenn $R^2 > 90 \%$ ist [55]. Bei geringeren Werten kann entweder die Referenzmethode fehlerhaft sein oder die Einstellungen der Kalibrationsparameter sind ungeeignet [58].

Es gibt zwei Validierungsmöglichkeiten, um die Güte einer NIR-Methode zu ermitteln. Bei der Kreuzvalidierung wird aus dem Kalibrierdatensatz jeweils das Spektrum einer Probe entnommen und mit den verbleibenden Proben die Kalibrierfunktion berechnet. Das entnommene Spektrum wird anhand der Kalibrierfunktion analysiert und der ermittelte Wert mit den Referenzwerten verglichen. Anschließend wird das entnommene Spektrum dem Kalibrierungssatz wieder zugefügt und das nächste entnommen. Dann wird ebenso verfahren, bis jede Probe einmal durch die Kalibrierfunktion aus den anderen Spektren analysiert wurde. Der Fehler, der sich aus der Differenz der ermittelten Werte aller Spektren zu den tatsächlichen Konzentrationen ergibt, ist der Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV). Er ist ein Maß für die mittlere Vorhersagegenauigkeit der Kalibration (Gl. 2.15).

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{M} \cdot \sum_{i=1}^M (Y_i^{\text{Ref}} - Y_i^{\text{NIR}})^2} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

Die zweite Validierungsmöglichkeit ist die Test-Set-Validierung. Dabei wird nur ein Teil der Proben zur Berechnung der Kalibrierfunktion verwendet und der andere Teil der Spektren, das sogenannte Test-Set, durch die Kalibration analysiert. Durch Vergleich der NIR-Werte der Testsetproben mit den Referenzwerten ergibt sich der Root Mean Square Error of

Prediction RMSEP (Gl 2.16). Auch er ist ein Maß für die Richtigkeit der Bestimmung der Kalibrierung [55, 57-59].

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{M} \cdot \sum_{i=1}^M (Y_i^{\text{Ref}} - Y_i^{\text{NIR}})^2} \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Vor dem Einsatz im Routinebetrieb ist es notwendig, die Güte der Kalibrierung mittels unabhängiger Proben zu testen. Zu diesem Zweck wird die Testset-Validierung durchgeführt.

Aus der Gesamtheit aller vermessenen Proben wird ein Fünftel dem Testset und vier Fünftel der Kalibration zugeordnet. Die Auswahl der Proben geschieht hier primär anhand der Referenzdaten. Die Spektren werden nach steigendem Analytgehalt sortiert und jedes fünfte Spektrum dem Testset zugeordnet. Die restlichen Spektren, sowie die Proben mit dem höchsten und dem geringsten Referenzwert, werden der Kalibrierung zugeteilt.

Die Zuordnung zum Testset kann an einigen Stellen nicht exakt dem erwähnten Muster folgen. Denn es ist wichtig, dass beim Testset ebenso die gesamte Variabilität der Proben vertreten ist wie in der Kalibration. Nur dann kann durch das Testset zuverlässig beurteilt werden, ob die Methode bei aller Variabilität der Proben den Analytgehalt zuverlässig bestimmen kann.

Ist die Methode zur Bestimmung unbekannter Proben geeignet, sind die Vorhersagefehler RMSEP und RMSECV etwa gleich groß und möglichst niedrig. Bezogen auf den Mittelwert der Analytgehalte des Testsets bzw. der Kalibrierung sollte der Fehler unter 10 %, besser noch unter 5 % liegen. Dies muss den Ansprüchen, die an die Kalibrierung gestellt werden, festgelegt werden. Der Fehler RMSECV wird auch herangezogen, um die geeignete Anzahl an PLS-Faktoren (=Ranks) festzulegen.

Wichtig ist die Robustheit der Methode, die Präzision und die Richtigkeit. Die Robustheit einer Methode zeigt sich in einer gleichmäßigen und geringen Abweichung zwischen den NIR- und den Referenzwerten der Testset-Proben, wenn das Testset einen möglichst großen Teil der Variabilität der Pflanzenmatrix enthält. Die Robustheit der Methode zeigt sich darin, dass möglichst alle Proben mit dem gleichen Fehler bestimmt werden und keine „Ausreißer“ erkennbar sind. Die Robustheit wird aus den Differenzen der beiden Methoden ermittelt und grafisch dargestellt.

Bezugsgröße zur Bestimmung der „Richtigkeit“ sind die Daten der Referenzmethode. Die Richtigkeit wird durch die Differenz, die zwischen den Referenzwerten und den NIR-Vorhersagen besteht, ausgedrückt. Diese Aussagen sind in den Vorhersagefehlern RMSECV und RMSEP enthalten, und können zusätzlich über eine Grafik der Abweichungen der beiden Methoden aufgezeigt werden.

Die Präzision wird durch die Streuung der Einzelmessungen um den Mittelwert angegeben. Sie wird ermittelt, indem die Standardabweichung (Gl. 2.17) [60] und der Variationskoeffizient (Gl. 2.18) unter Wiederholpräzisionsbedingungen berechnet werden.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

\bar{x} = Mittelwert der Einzelmessungen; x_i = Wert der Einzelmessung; N= Anzahl der Einzelmessungen

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 2.18})$$

Zur Erkennung von potentiellen Ausreißern in der Kalibrierung errechnet die Spektroskopiesoftware OPUS_NT 3.0 den FValue [59]. Der FValue ist ein quantitatives Maß für die Abweichung einer Probe vom gemessenen zum rekonstruierten Spektrum, welches bei der Kalibrierung berechnet wird. Bei Ausreißern ist diese Abweichung deutlich größer als bei den anderen Proben. Dies wird durch hohe F-Werte angezeigt [57].

$$F\text{Value} = \frac{(N - 1) \cdot (\text{Spec Res}_i)^2}{\sum_{j \neq i} (\text{Spec Res}_j)^2} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

SpecRes_i = Spektrale Residuen der Probe i;

SpecRes_j = Spektrale Residuen aller Proben j ohne Probe i

Ausreißer können aber auch über die Mahalanobis Distanz erkannt werden. Diese Distanz entspricht der Differenz des gemessenen Spektrums einer Probe zum Mittelwert aller rekonstruierten Spektren des Kalibrationsdatensatzes. Je größer diese Differenz ist, desto höher ist der Wert der Mahalanobis Distanz. Durch diesen Wert lässt sich nicht nur erkennen, ob die NIR-Messung fehlerhaft war, die Mahalanobis Distanz steigt auch an, wenn der Komponentenwert einer analysierten Probe außerhalb des Kalibrierbereiches liegt. Bei der Berechnung der Kalibrierfunktion werden die Distanzen aller Spektren berechnet. Daraus wird der maximal zulässige Wert für die Mahalanobis Distanz für eine sichere Analyse einer unbekannten Probe bestimmt. Dadurch kann die Zuverlässigkeit der Analyse kontrolliert werden.

Ausreißer dürfen jedoch nur dann aus der Kalibrierung entfernt werden, wenn entweder das Spektrum oder der Referenzwert nachweislich fehlerhaft ist oder die Probe nicht zur Grundgesamtheit der Proben passt. Denn nach der Entfernung nicht bestätigter Ausreißer werden bei der Neuberechnung der Kalibration wieder „Ausreißer“, also die Proben mit der größten Abweichung der Spektren zu den übrigen, angezeigt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Allgemeine Untersuchungen

3.1.1 Der Einfluss der Anzahl Scans auf die Quantifizierung

Bei Verwendung von nur einem Scan wird der Messarm des Interferometers einmal vor und zurück bewegt, d. h. bei jeder Wellenzahl wird nur ein Reflexionswert erhalten. Werden pro Messung mehrere Scans verwendet, wird der Messspiegel entsprechend mehrmals bewegt und die erhaltenen Werte zu einem Spektrum verarbeitet. Durch eine höhere Scanzahl nimmt das Rauschen in einem Spektrum gegenüber einem Einzelscan ab. Man kann somit über die Anzahl der Scans die Güte des Spektrums beeinflussen.

Um die optimale Anzahl an Scans zu bestimmen, wurden 30 entcoffeierte Schwarztees mit steigender Anzahl Scans vermessen. Der Coffeingehalt von 15 Proben betrug $< 0,1 \%$ Coffein, die anderen 15 Proben wiesen einen Gehalt von $0,2 \%$ bis $0,42 \%$ Coffein auf. Aus den Probenmessungen mit der gleichen Anzahl Scans wurde dann jeweils eine Kalibration erstellt und die Kreuzvalidierung berechnet. Die Güte der Kalibration zeigt sich in hohen Werten des Bestimmtheitsmaßes R^2 und einem niedrigen Vorhersagefehler RMSECV der Kreuzvalidierung. Eine Test-Set-Validierung wurde aufgrund der geringen Probenzahl nicht durchgeführt. Die Versuchsbedingungen sind im Kapitel 4.4.2 aufgeführt.

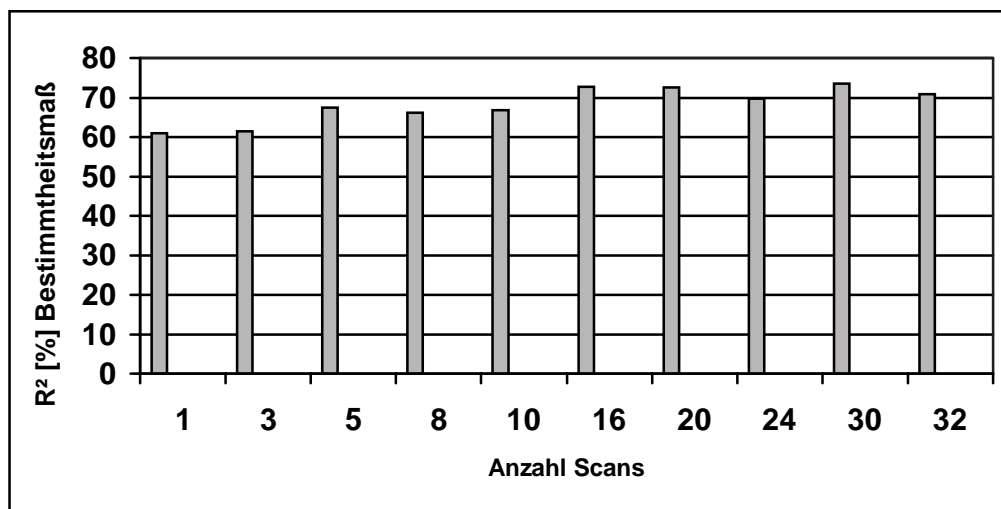


Abbildung 12a: Gegenüberstellung der Bestimmtheitsmaße R^2 [%] der Kalibrationen unterschiedlicher Scanzahlen zur Restcoffeinbestimmung in entcoffeiertem Schwarztee

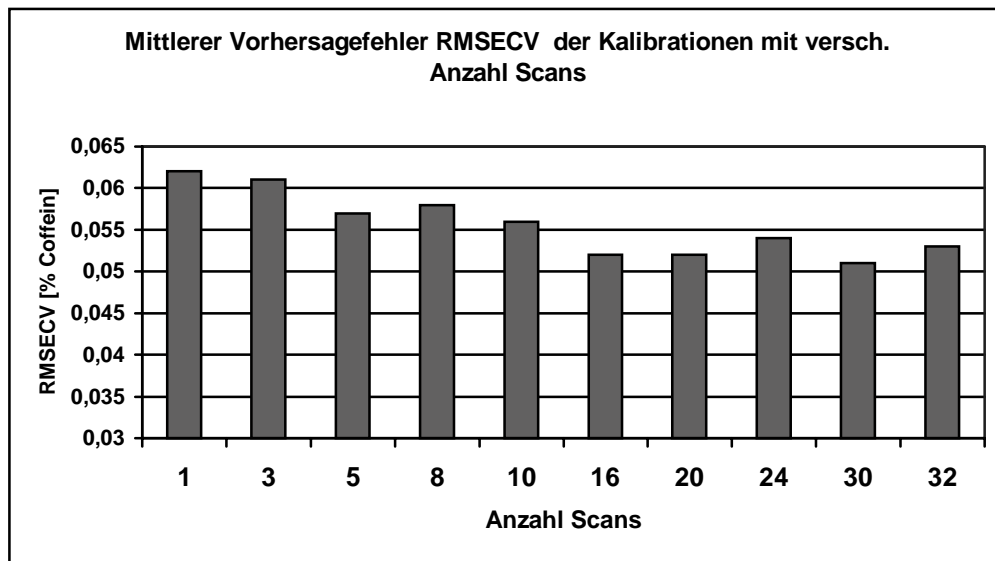


Abbildung 12b: Gegenüberstellung der RMSECV [% Coffein] der Kalibrationen unterschiedlicher Scanzahlen zur Restcoffeinbestimmung in entcoffeiniertem Schwarztee

Bei Verwendung von 5 Scans werden hohe R^2 (Abb. 12a) und bereits eine deutliche Verringerung des Vorhersagefehlers sichtbar (Abb. 12b). Der Fehler beträgt hier 0,057 % Coffein. Bei 16 Scans verringert sich der Fehler nochmals auf 0,052 % Coffein. Da eine Methode entwickelt werden sollte, mit der auch sehr geringe Coffeinkonzentrationen gemessen werden können, soll hier die Anzahl Scans mit dem kleinsten erreichbaren mittleren Vorhersagefehler herangezogen werden. Ein Scan über den gesamten Wellenzahlbereich dauert bei dem verwendeten FT-NIR-Gerät weniger als eine Sekunde. Eine Messdauer von weniger als 16 Sekunden ist noch akzeptabel.

Erhöht man die Anzahl der Scans pro Messung, wird keine wesentliche Verbesserung sichtbar, aber der Zeitaufwand je Messung wird größer. Deshalb empfiehlt sich der Einsatz von jeweils 16 Scans für die Leerkanal- und die Probenmessung.

3.1.2 Der Einfluss der Partikelgröße

Die Schwarztee-Muster werden für die NIR-Messungen mit der Fritsch-Zentrifugalmühle auf die Partikelgröße $\leq 0,2$ mm vermahlen (siehe dazu Kapitel 4.4.3).

Je größer die Partikel des Schwarztees sind, um so größere Hohlräume sind zwischen den Teilchen vorhanden. Durch diese Zwischenräume kann die Strahlung tiefer in die Probe eindringen. Dadurch erhöht sich die Absorption und verringert sich die Reflexion. Die Banden der erhaltenen Spektren werden dadurch schwächer und spektrale Information geht verloren. Bei geringen Partikelgrößen tritt weniger Absorption auf und somit werden stärkere Banden durch die vermehrte Reflexion erhalten.

Enthält eine Probe stark unterschiedliche Partikelgrößen, so sind die Ergebnisse einer Messung nicht reproduzierbar, da bei jeder neuen Befüllung des Messbechers die verschiedenen Partikel in unterschiedlichen Anteilen vorhanden sind. Weil sich die Strahlung an den Grenzflächen bricht, haben unterschiedliche Partikelgrößen einen großen Einfluss auf die Reflexion und somit auf die Messung und die NIR-Konzentrationswerte eines Analyten.

Beim Vermahlen der Schwarzteeproben kann durch Normierung (d.h. Einsatz einer Sieblochgröße von 0,2 mm in der Fritsch-Zentrifugalmühle) ausgeschlossen werden, dass sich größere Bestandteile in der Probe befinden. Bei Verwendung der IKA-Schlagmühle erhält man unterschiedliche Korngrößen, da kein definiertes Sieb verwendet werden kann.

Zehn entcoffeierte Schwarzteeproben wurden mit der IKA- und der Fritsch-Mühle (Sieblochgröße 0,2 mm) vermahlen (Versuchsbedingungen siehe Kapitel 4). Anschließend wurden von jeder Probe 6 Einzelmessungen mit je 16 Scans aufgenommen. Bei jeder Messung wurde der Probenbecher neu befüllt. Wie aus der Grafik (Abb. 13) zu ersehen ist, sind die Standardabweichungen (je 6 Einzelmessungen) der mittels Fritsch-Mühle gemahlenen Proben im Vergleich zu den mit der IKA-Mühle gemahlenen Proben deutlich geringer.

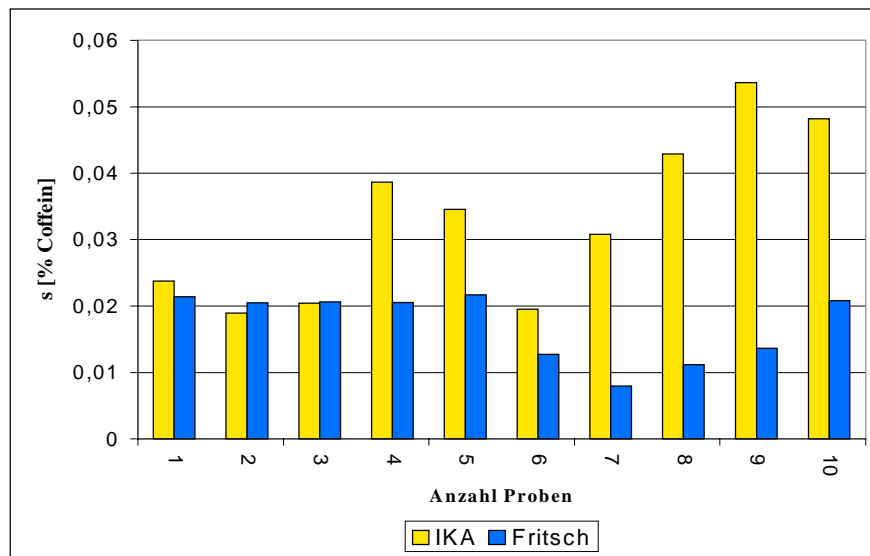


Abbildung 13: Vergleich der Standardabweichung s (Y-Achse) der Einzelmessungen von $< 0,1$ % Coffein-Schwarzteeproben bei unterschiedlicher Partikelgröße

Wie wichtig die gute Reproduzierbarkeit der Messungen ist, zeigt sich, wenn die Einzelmessungen der Proben mit einer bestehenden NIR-Kalibrierung quantifiziert werden. Bei einer 6-fach-Messung schwanken die NIR-Vorhersagen der einzelnen Messungen der „IKA-Probe“ zwischen 0,054 % und 0,15 % Coffein, die Werte der gleichen Probe, mit der Zentrifugalmühle vermahlen, schwanken nur im Bereich 0,084 % - 0,11 % Coffein. Folglich sollte bei der Probenvorbereitung auf eine einheitliche Partikelgröße geachtet werden, um eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen zu erreichen. Bei der vorliegenden Arbeit wurden deshalb alle Proben vor dem Vermessen mit der Fritsch-Zentrifugalmühle gemahlen.

3.1.3 Der Einfluss der Packungsdichte der Probe

Bei jeder Messung wird die Probe erneut in den Probenbecher gefüllt. Die Eindringtiefe der NIR-Strahlung in die Probe beträgt, wie im allgemeinen Teil bereits erwähnt, nur wenige Millimeter. Bei der Messung wird dadurch von einer Probe nur ein kleiner Teil pro Einzelmessung erfasst. Damit ein möglichst großer Teil der Probe bei den Messungen aufgenommen wird, wird der Probenbecher sechsmal mit der Probe neu befüllt und vermessen. Aus diesen Einzelmessungen wird dann das Mittelwert-Spektrum berechnet. Bei der Erstellung einer Kalibrierung und zur Quantifizierung einer Probe werden jeweils die Mittelwertspektren der Proben verwendet.

Die Packungsdichte der Partikel der Probe im Probenbecher hat einen Einfluss auf die Größe der Zwischenräume und dadurch auch auf die Eindringtiefe der Strahlung (vgl. 3.1.2). Die Dichte der Probe hängt u.a. vom Anpressdruck ab, der nach dem Befüllen auf die Probe ausgeübt wird. Die Packungsdichte und der Anpressdruck sollten daher bei Mehrfachmessungen möglichst gleich groß sein, damit einerseits die Reproduzierbarkeit der Spektren gewährleistet ist und andererseits die Partikeldichte keinen Einfluss auf das Spektrum hat.

Um zu untersuchen, wie groß der Einfluss der Packungsdichte auf die Spektren ist, wurden 50 gemahlene Hibiscusproben mit unterschiedlichem Anpressdruck vermessen.

Zunächst wurden die gemahlene Proben in den Probenbecher gefüllt und durch behutsames Aufklopfen des Bechers leicht komprimiert. Auf diese Weise waren die Partikel der Probe nur wenig dicht gepackt. Die Proben wurden dann sechsmal in das Messgefäß gefüllt und vermessen. Eine dichtere Packung der Hibiscuspartikel wurde durch Auflegen eines Gewichtes auf die Probe im Probenbecher erreicht. Dabei wurde ein Gewicht von 159,40 g und von 258,37 g verwendet. Die Packungsdichte bei Aufsatz von 258,37 g auf die Probe war maximal. Die Probe konnte auch durch Erhöhung des Gewichtes nicht weiter verdichtet werden. Die Hibiscusdrogen sind auch hier vor jeder Einzelmessung erneut in den Probenbecher gefüllt und mit dem jeweiligen Gewicht beschwert worden.

Aus den Mittelwertspektren der sechs Einzelmessungen (getrennt nach Befüllungsart des Messgefäßes) wurde jeweils eine Kalibrierung erstellt. Als Referenzdaten diente der titrimetrisch bestimmte Säuregehalt von Hibiscusdrogen (vgl. Kapitel 4). Der Konzentrationsbereich der Referenzwerte der 50 Proben erstreckt sich von 12,68 % bis 17,38 % Säuregehalt (berechnet als Citronensäure). Die statistischen Parameter wurden über die Kreuzvalidierung berechnet.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass bei der Partikeldichte, die nach Beschwerden mit 159,4 g erreicht wird, der kleinste Vorhersagefehler RMSECV und das höchste Bestimmtheitsmaß R^2 erzielt werden kann. Die statistischen Parameter der Methode mit der maximalen Dichte sind sogar schlechter als die der Methode, bei der die Proben ohne definierten Anpressdruck vermessen wurden.

Tabelle 2: Statistische Parameter der Kalibrierungen mit unterschiedlichem Anpressdruck zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

	Kalibrierung der Proben ohne Gewicht	Kalibrierung der Proben mit 159,40g beschwert	Kalibrierung der Proben mit 258,37g beschwert
R² [%]	83,12	84,62	82,13
RMSECV [% Citronensäure]	0,44	0,42	0,45
Anzahl Ranks	5	5	5

Offenbar ist eine große Dichte der Teilchen unvorteilhaft. Die Eindringtiefe der Strahlung ist bei Proben, die mit einem Gewicht von mehr als 250 g komprimiert wurden, geringer. Dadurch wird bei einer Messung ein geringerer Teil der Hibiscusdroge und damit weniger spektrale Information erfasst. Im Vergleich zur Befüllung mit dem Gewicht von 159,4 g weist die Probenbefüllung ohne Gewicht einen erhöhten RMSECV auf. Die Kalibrierung mit dem geringsten Vorhersagefehler und der besten Korrelation zwischen den Spektral- und den Referenzdaten ist aus den Proben erstellt worden, die mit einem Gewicht von 159,4 g beschwert wurden.

Zum Vergleich der Reproduzierbarkeit der Spektren wurden die durchschnittlichen Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der sechs Einzelmessungen des NIR-Gerätes der 50 Proben miteinander verglichen (Tabelle 3). Die Einzelmessungen wurden mit der jeweils entsprechenden NIR-Methode quantifiziert. Die Proben waren den Kalibriermodellen somit bekannt und damit sind die Abweichungen der erhaltenen NIR-Werte zu den Referenzwerten sicher geringer als bei der Vorhersage unbekannter Proben. Für die Bestimmung der Standardabweichung der Einzelmessungen ist dies nicht relevant, da bei allen Methoden, die verglichen werden, die Proben bekannt sind.

Tabelle 3: Streuung der Einzelmessungen bei Proben mit unterschiedlichem Anpressdruck

	Probe ohne Gewicht	Probe mit 159,40g beschwert	Probe mit 258,37g beschwert
MW [% Citr.sre]	15,23	15,09	15,24
s [% Citr.sre]	0,4494	0,3002	0,2728
VK [%]	2,95	1,99	1,79

Die Standardabweichungen der Einzelmessungen sinken mit zunehmender Dichte der Proben. Mit steigendem Anpressdruck wird die Reproduzierbarkeit der Spektren besser. Eine definierte Probenbefüllung durch Aufsatz eines Gewichtes ist offenbar vorteilhaft. Da sich jedoch der RMSECV bei der Methode mit der maximalen Partikeldichte im Gegensatz zu den anderen verschlechtert hat und sich der Variationskoeffizient im Falle einer Beschwerung mit 159,4 g gegenüber 258,37 g nur noch leicht verbessert, sind bei der vorliegenden Arbeit alle Proben mit dem Gewicht von 159,4 g beschwert worden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei nicht exakt festgelegten Vorgehensweisen bei der Vermahlung der Proben und der Befüllung des Probenbechers bei der Messung mit dem NIR-Spektrometer Unterschiede auftreten können. Durch die Festlegung der Art der Vermahlung und Einsatz eines Gewichtes beim Befüllen des Probengefäßes werden somit eine Reihe von Fehlermöglichkeiten ausgeschlossen.

3.2 Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee

3.2.1 Überprüfung einer vorhandenen Kalibrierung

Bei der Erstellung einer Kalibration zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes in entcoffeiniertem Tee sind neben den in Kapitel 2.5 beschriebenen Punkten weitere Besonderheiten zu beachten. Der kritische Aspekt ist hier die geringe Konzentration des Analyten. Quantitative Bestimmungen sind laut Herstellerangaben mit dem NIRS nur im Prozentbereich mit hinreichender Richtigkeit möglich [61]. Der Coffeingehalt im entcoffeinierten Schwarztee beträgt jedoch meist weniger als 0,5 %. Je nach Kundenanforderung wird der Schwarztee auf einen Coffeingehalt von $< 0,4$ % bzw. $< 0,1$ % Coffein extrahiert.

Wie im allgemeinen Teil beschrieben, ist die Teepflanze eine sehr inhomogene Matrix. Die Inhaltsstoffe der Pflanze unterliegen natürlichen Schwankungen, abhängig von Anbaugebieten, Klima, Erntezeitpunkt und Sorte [1]. Diese sind für die Varianz der Matrix verantwortlich. Ebenso verändert die Herstellung des Schwarztees die Matrix. Unterschiede in der Teeblattfärbung können beispielsweise bei identischem Coffeingehalt zweier Proben einen spektralen Unterschied verursachen, der bei der Quantifizierung mittels NIRS nicht auf den Coffeingehalt bezogen werden darf. Erschwerend kommt hinzu, dass zum Teil nicht „sortenrein“ entcoffeiniert wird.

Für die Bestimmung des Restcoffeingehaltes mittels NIR erfordert dies eine enorme Robustheit der Methode. Ebenso hoch sind die Anforderungen an die Richtigkeit der Kalibration, denn aus wirtschaftlichen Gründen soll der Restcoffeingehalt des Tees möglichst nahe am zulässigen Höchstwert von 0,4 % bzw. 0,1 % Coffein liegen.

Von Davies, et al. [62] wurde eine NIR - Methode zur quantitativen Bestimmung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee beschrieben, die im Routineeinsatz diesen Anforderungen nur unzureichend gerecht wurde. Die Kalibrierung besteht aus 145 Schwarzteeeproben mit einem Gehalt von 0,03 % bis 4,1 % Coffein, von denen parallel zu den NIR-Messungen die HPLC-Analytik als Referenzmethode angefertigt wurde.

Der Vorhersagefehler ist mit 0,036 % Coffein relativ hoch. Bei den Proben $< 0,4$ % Coffein liegt der Mittelwert bei 0,32 % Coffein, bei den Proben $< 0,1$ % Coffein liegt der Mittelwert bei 0,071 % Coffein. Ein Vorhersagefehler RMSECV von 0,036 % Coffein bedeutet somit

einen Fehler (bzgl. des Mittelwertes) von 11,25 % bzw. 50,70 %. Die Richtigkeit kann erhöht werden, wenn der Vorhersagefehler RMSECV geringer wird. Dies kann durch eine gezieltere Probenauswahl erreicht werden, wie im Folgenden belegt werden soll.

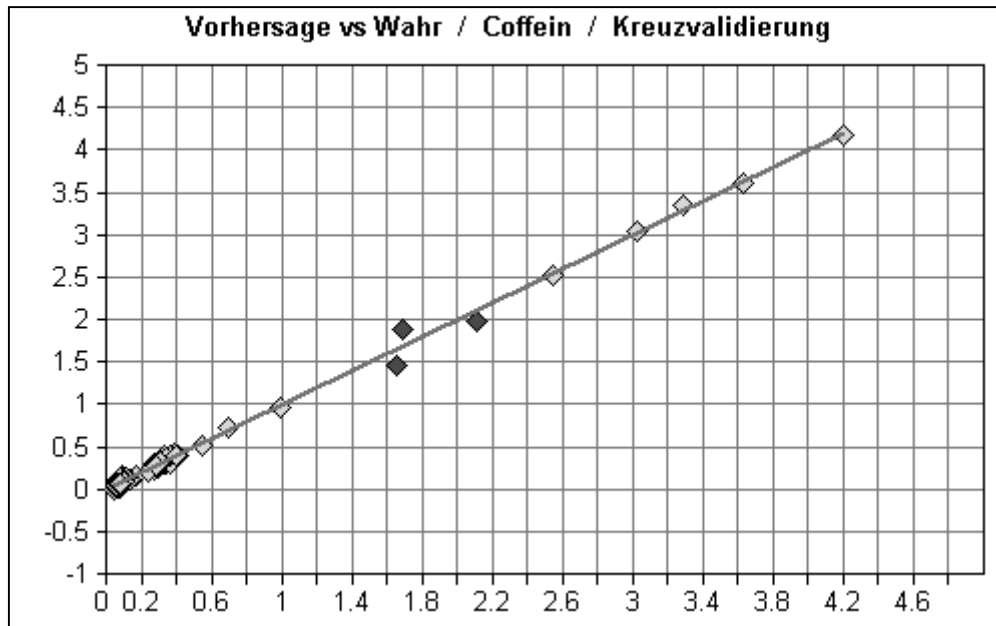


Abbildung 14: NIR-Bestimmung des Coffeingehaltes im entcaffeinierter Schwarztee, Kalibrierung nach Davies et al.[62]; Gegenüberstellung der HPLC-Werte [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

Bei der Methode nach Davies et al. [62] wurden 15 Spektren verwendet (Abb. 14), deren Coffeingehalt über den Konzentrationsbereich bei entcaffeinierter Tee hinausgeht. Diese Spektren stammen einerseits von Mischmustern aus entcaffeinierter mit nicht entcaffeinierter Tee, andererseits wurde auch reiner nicht extrahierter Schwarztee vermessen. Bei der Entcaffeinierung durch Ethylacetat-Extraktion wird nicht selektiv Coffein extrahiert, sondern ebenso eine Reihe weiterer Inhaltsstoffe, wie Theaflavine und Catechine. Die Matrix des Tees wird durch die Entcaffeinierung verändert. Dies lässt sich aus der Mahalanobis Distanz ablesen, die deutliche Unterschiede bei Teeproben vor und nach der Entcaffeinierung zeigt (Tab. 4).

Tabelle 4: Mahalanobis Distanzen entcaffeinierter und nicht entcaffeinierter Schwarztees

Probe	Mahalanobis Distanz von Schwarztee, nicht entcaffeinert	Mahalanobis Distanz von entcaffeinierter Schwarztee
1	1,2 %	0,02 %
2	2,4 %	0,10 %
3	1,4 %	0,08 %

Bei der Quantifizierung von so niedrigen Analytgehalten ist es wichtig, dass die Coffeingehalte der Proben, die in der Kalibration verwendet werden, größenordnungsmäßig den Gehalten der Realproben entsprechen.

Dies wird deutlich, wenn die 15 Spektren, die nicht von entcoffeynierten Schwarztee-Proben stammen, aus der Kalibrierung herausgenommen werden. Bei der Berechnung der neuen Kalibrierfunktion „Kalibration 130“ wird ein deutlich niedriger RMSECV von 0,02 % Coffeyn erhalten. Der RMSECV der Methode von Davies et al. [62] beträgt 0,036 % Coffeyn (Tab. 5). Das bedeutet, dass die Richtigkeit der Methode zunimmt, wenn der Konzentrationsbereich enger gefasst wird und die Probenauswahl auf die entcoffeynierten Schwarztees beschränkt wird.

Dass dabei das Bestimmtheitsmaß R^2 abnimmt, wenn die Spektren der nicht entcoffeynierten Schwarztees entfernt werden, liegt daran, dass der Konzentrationsbereich nun kleiner gefasst ist. Dies ist bei Betrachtung der Formel zur Berechnung von R^2 (S. 31) nachvollziehbar. Die mittlere Konzentration Y_m wird durch die wenigen hohen Coffeingehalte der nicht entcoffeynierten Schwarztees erhöht und damit R^2 erhöht. Bei Wegfall dieser Proben verringert sich Y_m entsprechend und damit auch der Wert für R^2 .

Bei einer homogenen Abdeckung der verwendeten Konzentrationsspanne fällt R^2 nicht so enorm ab, da bei Entnahme einiger hoher Konzentrationswerte aus der Kalibrierung der Wert für Y_m nicht so deutlich sinkt.

Bei der Methode nach Davies et al. [62] lag die Mehrzahl der Proben jedoch unter 0,5 % Coffeyn und nur etwa 10 % der Kalibrierproben über dem Gehalt von 0,5 % bis 4,2 % Coffeyn. Durch einige hohe Analytgehalte kann das Bestimmtheitsmaß steigen und somit eine bessere Methode vortäuschen, als eigentlich vorhanden ist. Eine genaue Prüfung der erhaltenen statistischen Daten der Kalibrierung ist, wie hier gezeigt, oft nötig.

Tabelle 5: Statistische Parameter der Kalibrationen zur Restcoffeinbestimmung in entcoffeiniertem Schwarztee mit unterschiedlicher Probenzusammensetzung

	Kalib. nach Davies et al. [62]	Kalibration 130	Kalibration 352	Kalibration 337
Anzahl Proben	145	130	352	337
Konzentrations- Bereich [% Coffein]	0,03 – 4,1	0,03 – 0,5	0,03 – 4,1	0,03 – 0,5
Anzahl Ranks	10	10	12	12
R² [%]	99,6	97,3	99,5	96,5
RMSECV [% Coffein]	0,036	0,020	0,030	0,022

Dies konnte auch bei der Erweiterung der Kalibrierung auf 337 Spektren festgestellt werden. Werden der erweiterten Methode „Kalibration 337“ die 15 Spektren mit den hohen Coffeingehalten zugefügt, steigt der RMSECV von 0,022 % Coffein auf 0,030 % Coffein (Tab. 5). Auch hier verschlechtert sich der Vorhersagefehler und damit die Richtigkeit der Kalibrierung durch Aufnahme der Spektren des nicht entcoffeinierten Schwarztees.

Deshalb wurde bei den folgenden Kalibrierungen darauf geachtet, dass nur Proben mit solchen Gehalten in die Methoden einfließen, die später mit dieser Methode auch bestimmt werden sollen.

Schließlich gibt es noch ein weiteres Problem, weshalb die Methode von Davies et al. [62] in der Routineanalytik nicht einsetzbar war. Bei der Quantifizierung der täglich anfallenden Teeproben von der Entcoffeinierungsanlage traten bei einigen Chargen größere Abweichungen der NIR- gegenüber den HPLC-Werten auf (Abb. 15).

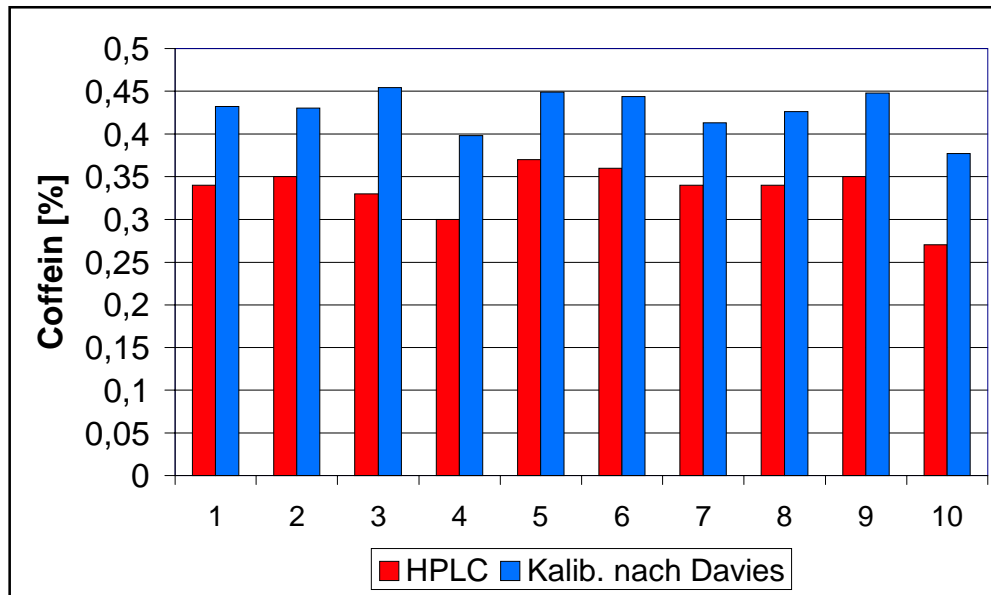


Abbildung 15: Quantifizierung der Restcoffeingehalte einer „Ausreißercharge“ entcaffeinierter Schwarztees mittels HPLC (rot) und der NIR-Kalibrierung nach Davies et al.[62](blau)

Während die Coffeingehalte mit der Referenzmethode bei diesen Proben deutlich unter dem Grenzwert von 0,4 % Coffein lagen, wurden mit der NIR-Methode nach Davies et al. [62] deutlich höhere Werte erhalten (vgl. Abb. 15). Da diese Unterschiede nicht bei allen Chargen auftraten und die Abweichungen beider Methoden innerhalb einer Charge nahezu konstant waren, ist das als Hinweis zu werten, dass die Matrix dieser Proben der Kalibration unbekannt war und somit der Gehalt nicht zuverlässig bestimmt werden konnte. Als Beleg dafür kann die Mahalanobis Distanz herangezogen werden. Die Mahalanobis Distanz liegt bei den „Ausreißerproben“ deutlich höher als bei den Proben, deren Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden größer ist.

In der NIR-Methode von Davies et al. [62] sind nur 145 Spektren enthalten. Dies reicht offensichtlich nicht aus, um die gesamte Variabilität der Teematrix zu erfassen. Die Erweiterung dieser Kalibrierung auf 337 Spektren („Kalibration 337“) ergibt bereits eine deutliche Verbesserung der Übereinstimmung der HPLC- mit den NIR-Werten (Abb. 16 und Tab. 5).

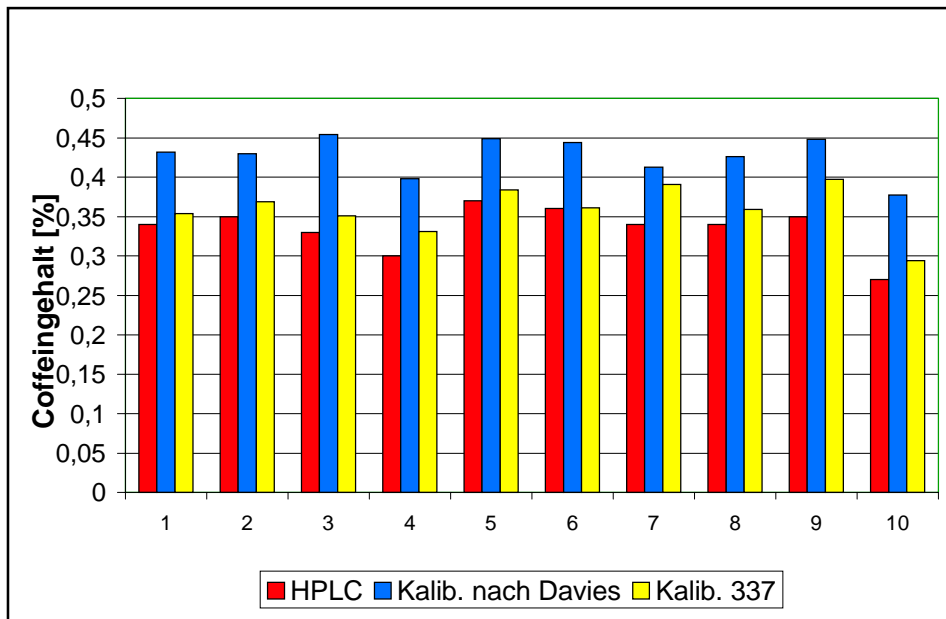


Abbildung 16: Quantifizierung der Restcaffeingehalte der „Ausreißercharge“ mittels HPLC (rot) und der NIR-Kalibrierungen nach Davies et al.[62](blau) und Kalib. 337 (gelb)

Um sicher zu stellen, dass die neue Kalibrierung die Caffeingehalte nicht generell niedriger vorhersagt, da nur Spektren im Konzentrationsbereich von 0,02 % bis 0,4 % Caffein aufgenommen wurden, ist in Abbildung 17 nochmals eine Gegenüberstellung der Methoden zu sehen. Verwendet wurden die Proben, die mit der ursprünglichen Kalibration bereits gute Übereinstimmung mit der Referenzmethodik gezeigt haben. Die Vorhersage mit der neuen Methode hat sich nicht verschlechtert und die Caffeinwerte mit der erweiterten Kalibration sind nicht generell niedriger bestimmt worden (Abb. 17).

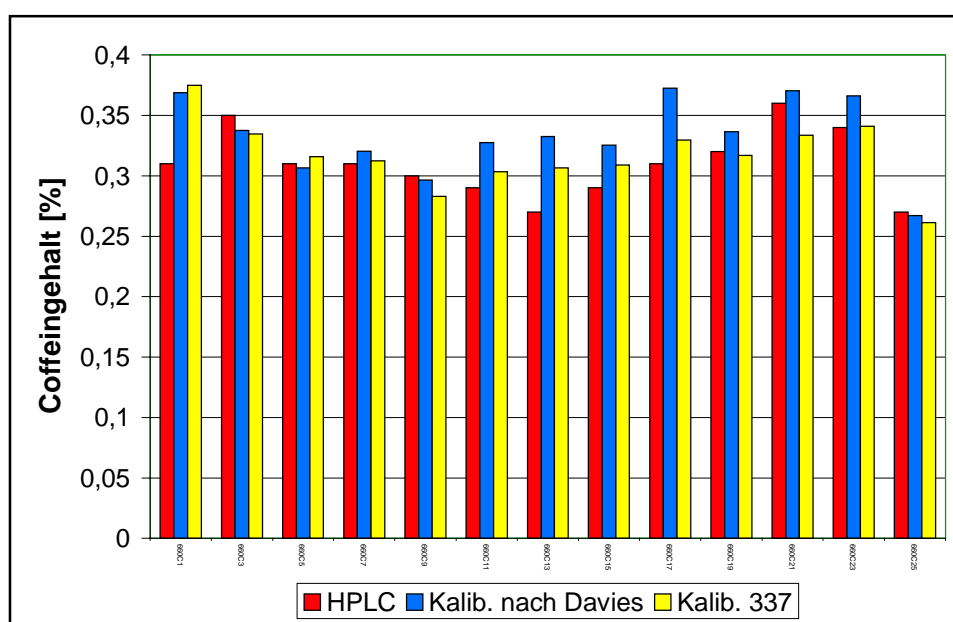


Abbildung 17 : Quantifizierung der Restcaffeingehalte ausgewählter Proben von entcaffiniertem Schwarzteemittels HPLC (rot) und der NIR-Kalibrierungen nach Davies et al. [62] (blau) und Kalib. 337 (gelb)

Noch deutlicher wird dies bei Betrachtung der Proben mit Gehalten $< 0,1$ % Coffein (Abb. 18). Die Vorhersagen mit der Kalibration „Kalib. 337“ liefern wesentlich geringere Differenzen zu den HPLC-Werten.

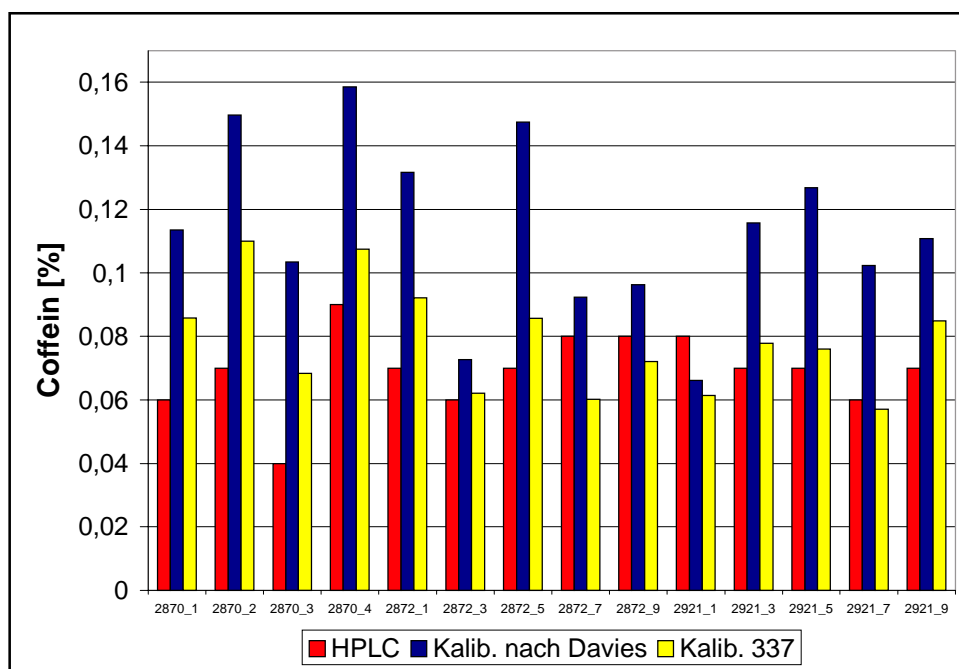


Abbildung 18 : Quantifizierung des Restcoffeingehaltes von Schwarzteeeproben $< 0,1$ % Coffein mittels HPLC (rot) und der NIR-Kalibrierungen nach Davies et al. [62] (blau) und Kalib. 337 (gelb)

Verdeutlicht wird die Verbesserung der Kalibration durch die veränderte Probenauswahl auch bei Betrachten der Wiederholpräzision. Diese ist nicht nur abhängig von den Geräteparametern und der eingesetzten Optik, sondern auch von der verwendeten Kalibrierung. In Tabelle 6 ist zu erkennen, dass die Standardabweichung bei der Sechsfachmessung einer Probe unter Wiederholpräzisionsbedingungen von der Methode nach Davies et al. [62] zur Kalibration „Kalibration 337“ abgenommen hat.

Tabelle 6: Präzision der Kalibration nach Davies et al. [62] im Vergleich mit der Präzision der erweiterten Methode und der HPLC

	Kalib. nach Davies	Kalibration 337	HPLC
MW [% Coffein]	0,0740	0,0837	0,076
s [% Coffein]	0,0178	0,0148	0,0093
VK [%]	24,00	17,68	12,20

Es konnte gezeigt werden, dass die Probenauswahl auf die Richtigkeit und die Robustheit einer Methode einen großen Einfluss hat. Deshalb sollte auf die Auswahl der Proben die größte Sorgfalt verwendet werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde eine völlig neue Methode erstellt, die in Kapitel 3.2.2 vorgestellt wird.

3.2.2 Die Entwicklung einer neuen Kalibrierung zur Quantifizierung des Restcoffeingehaltes im entcoffeierten Schwarztee

Die Kalibrierung „Entcoff“ enthält Spektren von 500 Proben, die über einen Zeitraum von drei Jahren gemessen wurden, um möglichst viele Matrixeinflüsse, wie sie in Kap. 2.5 beschrieben werden, in die Kalibrierung mit aufzunehmen. Es wurden ausschließlich entcoffeierte Schwarztees vermessen, mit den nach Kapitel 3.1 ermittelten optimalen Bedingungen (vgl. Kapitel 4.4.5). Die Proben wurden direkt nach der Entcoffeinierung vermahlen, sechsmal neu in den Probenbecher gefüllt und mit je 16 Scans vermessen. Die NIR-Messung erfolgte in etwa zeitgleich mit der Coffeianalyse unter Verwendung der HPLC (vgl. Kapitel 4.3.1). Aus den sechs Einzelmessungen des NIRS wurde jeweils das Mittelwertspektrum berechnet und mit den dazugehörigen HPLC-Werten in die Kalibrierung aufgenommen. Um die optimale Datenvorbehandlung und die günstigsten Frequenzbereiche zu ermitteln, wurde für die verschiedenen Modelle die Kreuzvalidierung berechnet und deren statistische Ergebnisse untereinander verglichen (Tab. 7). Die Frequenzbereiche sind bei allen Modellen zunächst gleich und von den Methoden aus Kap. 3.2.1 übernommen worden.

Tabelle 7: Parameter der Kalibrationen zur Coffeinbestimmung in entcoffeiertem Schwarztee mit unterschiedlichen Datenvorbehandlungen

Name	Anzahl Spektren	Frequenzgrenzen [cm ⁻¹]	Datenvorbehandlung	Ranks	R ² [%]	RMSECV [% Coffein]
Entcoff	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	Vektornormierung	13	95,77	0,027
Entcoff 2	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	Eliminierung eines const. Offsets	14	94,56	0,042
Entcoff 3	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	Subtraktion einer geraden Linie	15	94,78	0,0415
Entcoff 4	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	Min-Max-Normierung	15	95,09	0,036
Entcoff 5	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	MSC	13	95,52	0,031
Entcoff 6	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	1. Abl. & VN	13	95,38	0,034
Entcoff 7	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	1. Abl.	14	94,54	0,0435
Entcoff 8	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	1. Abl. & MSC	13	95,29	0,35
Entcoff 9	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	2. Abl.	11	89,94	0,066

Bei der Gegenüberstellung der Vorhersagefehler RMSECV weist die Kalibrierung „Entcoff“, mit der Vektornormierung als Datenvorbehandlung, den geringsten RMSECV auf. Die Anzahl der Ranks ist bei „Entcoff 9“ noch geringer, jedoch liegt hier der RMSECV bei mehr als dem doppeltem Wert. Die Vektornormierung ist in diesem Fall die optimale Datenvorbehandlung.

Schließlich müssen die Frequenzbereiche gewählt werden, bei denen eine gute Korrelation zwischen den Veränderungen der Spektraldaten und den Konzentrationsdaten besteht. Bei den in Tabelle 8 aufgelisteten Ergebnissen wurde nun als Datenvorbehandlung die Vektornormierung gewählt und die Modelle für verschiedene Frequenzbereiche über die Kreuzvalidierung berechnet.

Tabelle 8: Parameter der Kalibrationen zur Coffeinbestimmung in entcaffiniertem Schwarztee mit unterschiedlichen Frequenzbereichen

Name	Anzahl Spektren	Frequenzgrenzen [cm ⁻¹]	Datenvorbehandlung	Ranks	R ² [%]	RMSECV [% Coffein]
Entcoff	500	6253 - 5396,7 4848,9 - 3822,8	Vektornormierung	13	95,77	0,027
Entcoff 10	500	8700 - 5360 4960 - 3500	Vektornormierung	14	94,62	0,043
Entcoff 11	500	11500 - 3500	Vektornormierung	14	93,42	0,053
Entcoff 12	500	7495 - 3825	Vektornormierung	18	95,78	0,027
Entcoff 13	500	7500 - 5350 4950 - 3800	Vektornormierung	15	95,75	0,027
Entcoff 14	500	8700 - 5360 4960 - 3500	Vektornormierung	15	93,89	0,049
Entcoff 15	500	12000 - 3500	Vektornormierung	15	93,24	0,052

Die Ergebnisse der Tabelle 8 zeigen bei den Kalibrationen „Entcoff 12“ und „Entcoff 13“ gleich gute Ergebnisse beim Bestimmtheitsmaß und dem Vorhersagefehler, wie bei der „Entcoff“-Methode mit den Frequenzbereichen, die bereits von Davies et al. [62] eingesetzt wurden. Aber die Verwendung von 18 bzw. 15 Faktoren (= Ranks) ist von Nachteil. Es ist sinnvoll, so wenig Faktoren wie möglich einzusetzen, da sonst die Gefahr der Überbestimmung besteht (vgl. Kap. 2.5 und 2.6).

Die Kalibrierung erzielt keine besseren Ergebnisse, wenn der gesamte Spektralbereich, wie bei dem Modell „Entcoff 15“, zur Auswertung herangezogen wird. Die Frequenzbereiche 6253 cm^{-1} - $5396,7\text{ cm}^{-1}$ und $4848,9\text{ cm}^{-1}$ - $3822,8\text{ cm}^{-1}$ sind für die Restcoffeingehaltsbestimmung im entcoffeinierten Schwarztee am besten geeignet. In diesen Bereichen liegen die Absorptionsbanden des reinen Coffeins. Beim entcoffeinierten Schwarztee sollten in eben diesen Frequenzbereichen die Banden liegen, die vom Coffeingehalt des Tees hervorgerufen werden. Dies wird durch die Ergebnisse der Tabelle 8 bestätigt. Durch Ausschluß der Wasserbande, die bei 5000 cm^{-1} bis 5300 cm^{-1} liegt, ist die Methode außerdem unabhängig vom Feuchtigkeitsgehalt der Proben.

Die gemessenen Spektren der Kalibrierung werden nach steigendem Coffeingehalt sortiert und jedes fünfte dem Testset zugeordnet. Die Probe mit dem höchsten und dem geringsten Coffeingehalt wird in der Kalibrierung belassen, damit die Gehaltsspanne der Kalibrierung größer als die des Testsets ist. Die restlichen Spektren wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktion herangezogen. Da die Gehaltsspanne und die Mittelwerte der Coffeingehalte beim Testset und der Kalibration in etwa gleich sind (Tab. 9), kann von einer homogenen Verteilung der Proben bzgl. des Coffeingehaltes ausgegangen werden.

Tabelle 9: Verteilung der Coffeingehalte der Proben bei Testset und Kalibration

	Gehaltsspanne [% Coffein]	Mittelwert [% Coffein]
Kalibration	0,02 - 0,60	0,30
Testset	0,02 - 0,47	0,29

Aus den folgenden Grafiken ist die gute Übereinstimmung der Verteilung der Proben bei Testset und Kalibrierung (Abb. 19 und 20) zu sehen.

Da bei der Inhaltsstoffbestimmung in einer Pflanzenmatrix keine Modellmischungen zum Ausgleich von Konzentrationslücken herangezogen werden können (vgl. Kapitel 2), müssen diese, wie sie z.B. zwischen 0,13 % und 0,17 % Coffein vorkommen, in der Regel akzeptiert werden.

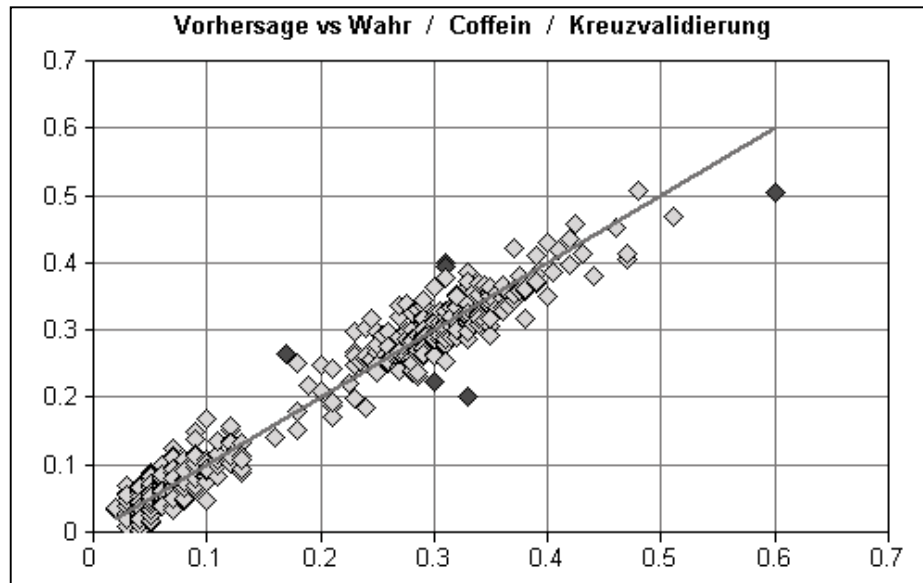


Abbildung 19: Kalibrierung „Entcoff“; Gegenüberstellung der Referenzwerte HPLC [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

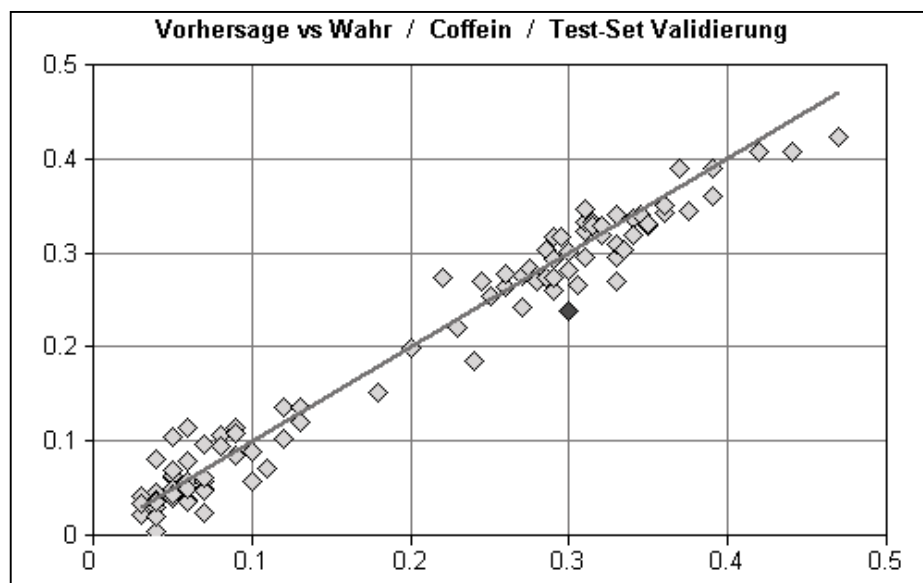


Abbildung 20: Testset zur Bestimmung der Güte der Kalibration „Entcoff“; Gegenüberstellung der Referenzwerte HPLC [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

Der Vorhersagefehler RMSECV der „Entcoff“-Methode (Tab. 10) ist nur geringfügig höher als bei der „Kalib. 337“-Methode (vgl. Tab. 5, S. 43). Die Ursache dafür kann in der größeren Streuung durch die erhöhte Anzahl Proben liegen. Der Vorhersagefehler RMSECV der Kreuzvalidierung stimmt mit dem Fehler RMSEP des unabhängigen Testsets gut überein. Der Fehler, mit dem die Kalibrierung die Kalibrierproben bei der Kreuzvalidierung vorhersagt, ist identisch mit dem Fehler, mit dem unbekannte Proben des Testsets bestimmt werden.

Tabelle 10: Statistische Parameter der „Entcoff“-Methode und des Testsets

Anzahl Ranks	R ² [%] der Kalibration	RMSECV [% Coffein]	R ² [%] des Testsets	RMSEP [% Coffein]
13	95,77	0,027	96,51	0,024

Um festzustellen, ob die Methode „Entcoff“ in der Routineanalytik zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes im entcoffeinierten Schwarztee einsetzbar ist und dadurch die zeitaufwendige HPLC-Methode ersetzen kann, wurden 780 unabhängige Proben aus der laufenden Produktion, über einen Zeitraum von 18 Monaten mit der NIRS und der HPLC unter Routinebedingungen (vgl. Kapitel 4.3.1 und 4.4.5) vermessen. Jeweils die Hälfte der Proben stammte von Produktionschargen, die auf einen Gehalt von < 0,1 % bzw. < 0,4 % Coffein extrahiert wurden. Beide Probensätze wurden voneinander getrennt betrachtet.

3.2.2.1 Die Beurteilung der Güte der Kalibrierung bei Schwarzteeproben mit Coffeingehalten < 0,4 %

Da mit der Übernahme der Referenzwerte in die Kalibrierung der NIR-Methode auch der Fehler der Referenzmethode übernommen wird, kann die Bestimmung der Proben mittels NIRS nicht besser sein als die der HPLC-Methode.

Die NIRS ist jedoch unabhängiger vom Laborpersonal, da auf aufwendige Probenaufarbeitungen, Verdünnungsschritte und das Ansetzen von Standardlösungen verzichtet werden kann und die damit verbundenen möglichen Fehlerquellen wegfallen. Lediglich auf das Befüllen des Probenbechers und die Packungsdichte der Partikel hat der Mitarbeiter Einfluss. Durch genaues Festlegen der Bedingungen können die dadurch entstehenden Varianzen der Messungen minimiert werden (vgl. Kapitel 3.1). Somit ist es möglich, bestimmte Fehler, die bei der Referenzmethode auftreten, mit einer funktionierenden NIR-Methode zu entdecken. In Abbildung 21 sind bei der Differenz der HPLC- zu den NIR-Werten, bei den < 0,4 % Coffein entcoffeinierten Schwarztees aus dem Jahr 2000, zwischen Probe 40 und 70 deutlich größere Abweichungen zu erkennen als bei den anderen Proben. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein neuer Laborant an der HPLC eingearbeitet und die Teeproben nicht exakt nach Arbeitsanweisung aufgearbeitet. Bei Wiederholung der Analysen durch erfahrenes Personal bestätigten sich die NIR-Werte mit den üblichen Abweichungen zwischen den beiden Methoden. Die NIR-Spektrometrie ist in diesen Bereichen die zuverlässigere und stabilere Methode.

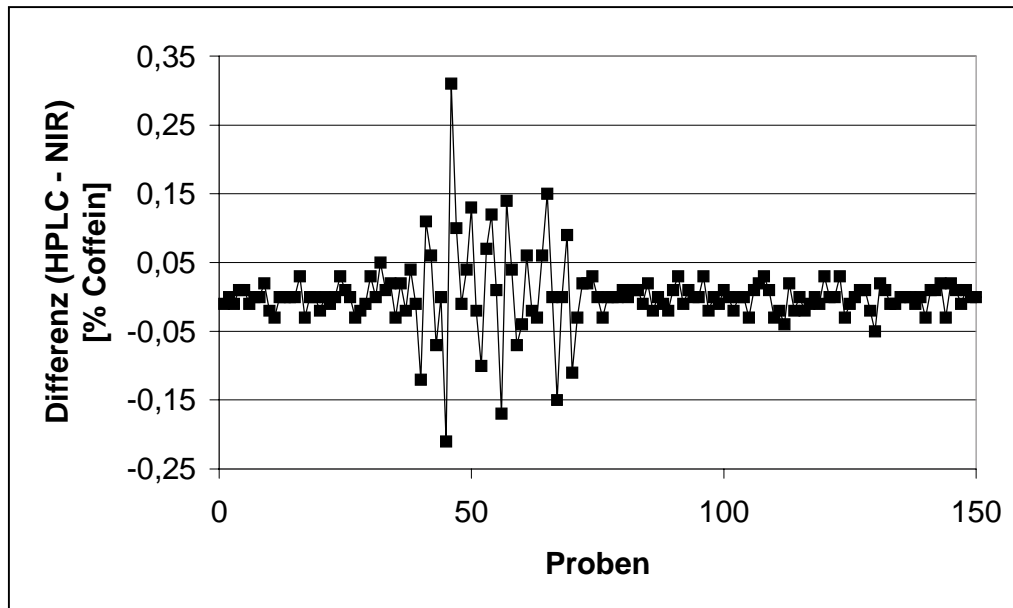


Abbildung 21: Unbereinigte Daten 2000; Die Differenzen zwischen der NIR-„Entcoff“-Methode und der HPLC-Referenzmethode im Laufe des Jahres 2000; Quantifizierung unabhängiger Proben des entcoffeierten Schwarztees

Werden die Differenzen der beiden Methoden ohne die Proben 40 – 70 betrachtet, ist eine gleichmäßige Verteilung der Abweichungen zu erkennen (Abb. 22 und 23). Die Schwankungen bewegen sich in beiden Jahren innerhalb eines schmalen Bereiches und es wird keine der beiden Richtungen bevorzugt. Die Proben sind in zeitlicher Reihenfolge aufgetragen und innerhalb des beobachteten Zeitraums von 18 Monaten ist kein zeitlicher Trend zu erkennen.

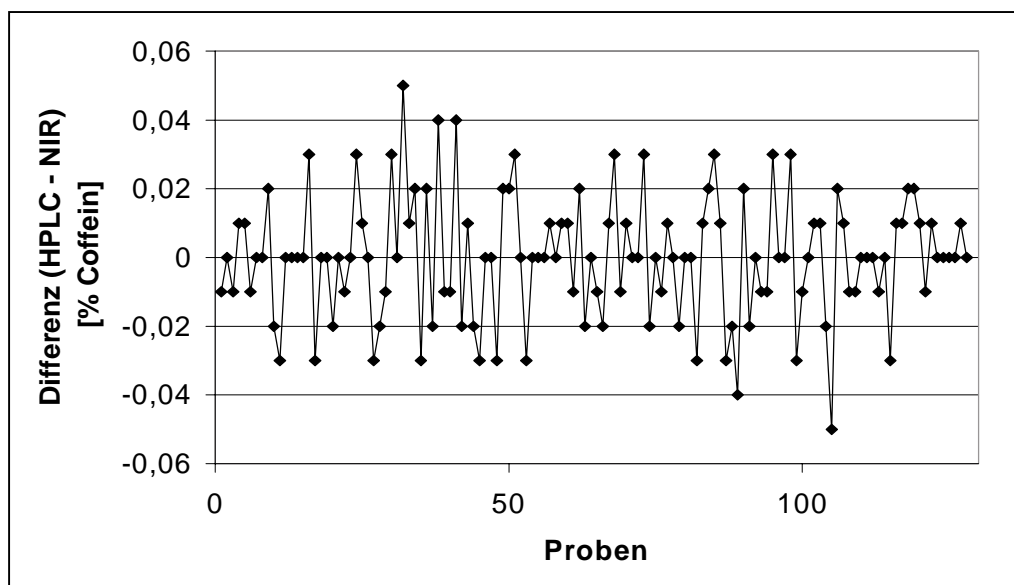


Abbildung 22: Bereinigte Daten 2000; Die Differenzen zwischen der NIR-„Entcoff“- Methode und der HPLC-Referenzmethode im Laufe des Jahres 2000; Quantifizierung unabhängiger Proben des entcoffeierten Schwarztees

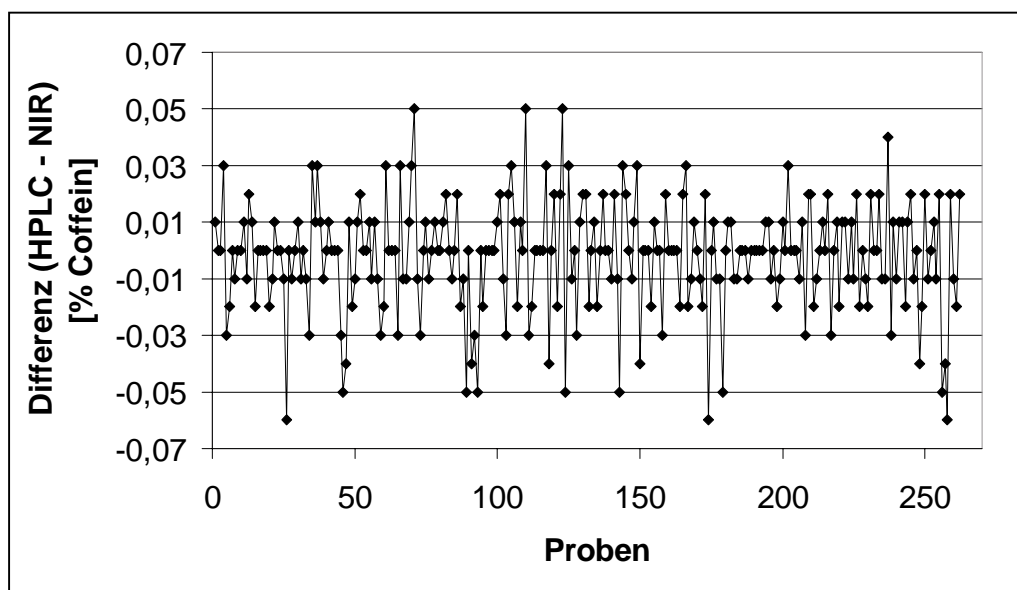


Abbildung 23: : Bereinigte Daten 1999; Die Differenzen zwischen der NIR-„Entcoff“-Methode und der HPLC-Referenzmethode im Laufe des Jahres 1999; Quantifizierung unabhängiger Proben des entcoffinierten Schwarztees

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methode bezüglich der Robustheit der Kalibration und der Stabilität der Vorhersage der Coffeinwerte bei den Chargen, die auf $< 0,4$ % Coffein entcoffiniert werden, einsetzbar ist. Im Folgenden soll nun die Richtigkeit der Methode näher betrachtet werden.

Tabelle 11: Vorhersagefehler von 390 unabhängigen entcoffinierten Schwarztee-proben $< 0,4$ % Coffein

RMSEP [% Coffein]	Mittelwert der unabh. Proben [% Coffein]	RMSEP bzgl. des Mittelwertes [%]
0,024	0,29	8,28

Auf den durchschnittlichen Mittelwert der 390 untersuchten Proben bezogen, beträgt der Vorhersagefehler $RMSEP = 0,024$ % nur 8,28 % (Tab. 11). Für Proben mit Coffeingehalten von 0,4 % ist dieser Fehler akzeptabel.

Laut Kundenanforderung soll der Schwarztee auf einen Coffeingehalt $< 0,4$ % extrahiert werden. Für die Produktion ist es wichtig, Proben, die einen Coffeingehalt von $\geq 0,4$ % aufweisen, zu erkennen, damit diese nicht in den Verkauf gelangen. Durch den Fehler der Vorhersage können nun die HPLC-Werte der Proben, die mit dem NIRS zwar mit einem Wert knapp $< 0,4$ % Coffein quantifiziert werden, über diesem Grenzwert liegen. Außerdem könnten Proben, die laut NIRS einen höheren Coffeingehalt als 0,4 % aufweisen, mit der Referenzmethode noch unter diesem Wert liegen. Ersetzt nun die NIRS-Methode die

bestehende HPLC-Analytik, so würden diese Proben erneut entcoffeiiniert werden, obwohl sie laut HPLC-Analytik den Kundenanforderungen entsprechen und verkauft werden könnten. Das kann vermieden werden, wenn die HPLC durch die NIR-Methode nur teilweise ersetzt wird. Es könnten alle Proben zunächst mittels NIRS untersucht werden. Dann sollten aber alle Proben, die laut NIRS überhöht sind, mit der HPLC nachuntersucht werden. Außerdem sollten diejenigen Proben mit der HPLC nachuntersucht werden, die einen bestimmten NIR-Wert überschreiten, bei dem der Referenzwert der Proben über dem zulässigen Grenzwert liegt. Um zu ermitteln, ab welchem NIR-Wert der Coffeingehalt mit der HPLC-Methode den Grenzwert von 0,4 % Coffein überschreitet, ist aus den Daten der über 18 Monate erfolgten Analysen eine Simulation errechnet worden (Abb. 24).

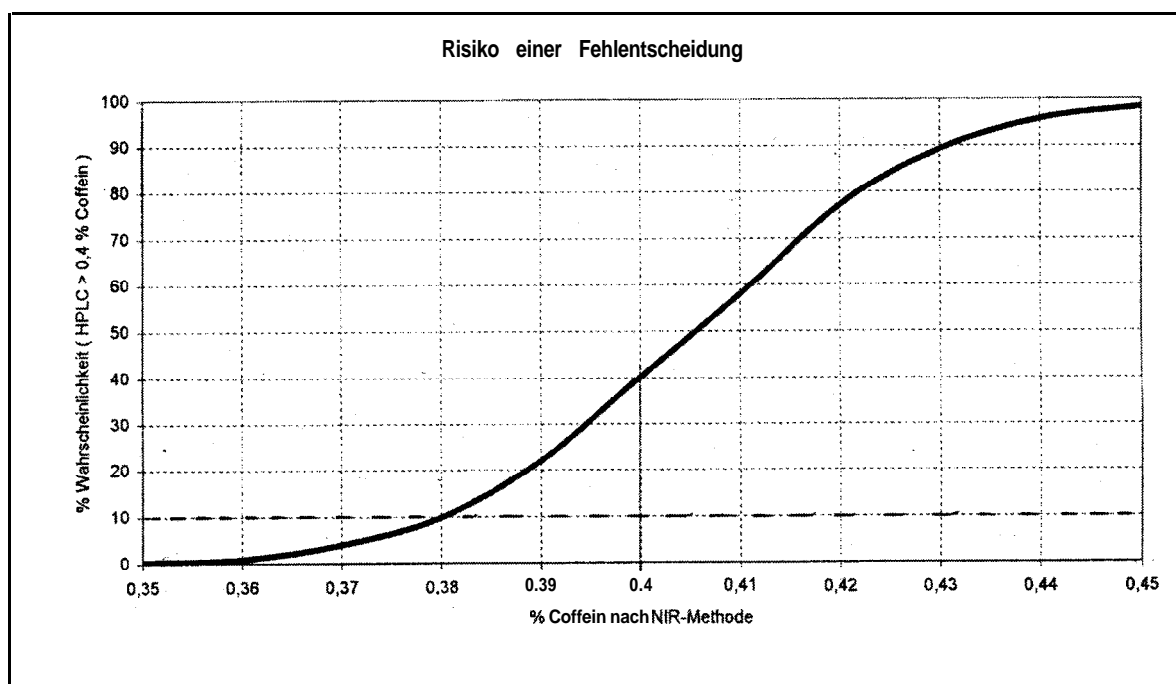


Abbildung 24: Simulation, errechnet aus den Daten der Analysen der 390 Schwarztee-Proben der Jahre 1999 und 2000 zur Ermittlung des NIR- Coffeingehaltes, bei dem der Coffeingehalt der HPLC > 0,4 % ist; entnommen aus Lit. [63]

Die Grafik zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass der HPLC-Wert über 0,4 % Coffein liegt, bei einem NIR-Wert von 0,4 % Coffein 40 % beträgt. Bei einem NIR-Wert von 0,35 % Coffein liegt die Wahrscheinlichkeit bei nahezu null. Proben mit einem NIR-Wert unter 0,35 % Coffein liegen demnach mit fast 100 % Sicherheit mit ihren HPLC-Werten unter 0,4 % Coffein. Damit sicher gestellt ist, dass keine Probe mit einem Coffeingehalt, der höher als der zulässige Grenzwert ist, die Produktion verlässt, müssten entweder alle Proben über 0,35 % Coffein (NIR-Wert) erneut in die Entcoffeiinierungsanlage eingebracht werden oder per HPLC-Methode ein Vergleichswert ermittelt werden. 9,5 % der NIR-Werte der 390

untersuchten Proben liegen über 0,35 % Coffein, aber nur 37,8 % dieser Proben lägen bei einer Nachuntersuchung mit der HPLC tatsächlich über dem Grenzwert. Das bedeutet, dass einerseits mehr als 90 % der HPLC-Analysen in diesem Konzentrationsbereich des Coffeins von der NIRS ersetzt werden können und von den 9,5 % Nachuntersuchungen fast zwei Drittel als nicht überhöhte Proben in den Verkauf gehen können. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Proben über dem entsprechenden NIR-Wert zunächst per HPLC zu untersuchen und nur die tatsächlich erhöhten Proben weiter zu entcoffeinieren.

Werden nur Proben ab dem NIR-Wert von 0,38 % Coffein nachuntersucht, liegt das Risiko unter 10 %, dass die Proben mittels HPLC Coffeingehalte über dem Grenzwert ergeben. Das Probenaufkommen für die HPLC-Analytik läge in diesem Fall bei nur 6,1 % bezogen auf die 390 untersuchten Proben. Da die Ergebnisse der NIR-Untersuchungen in wenigen Minuten vorliegen, kann entsprechend der Ergebnisse noch in den laufenden Entcoffeinierungsprozeß eingegriffen werden. Durch den geringeren Kostenaufwand der NIR-Analytik tritt bei Reduzierung der HPLC-Analytik auch ein deutlicher Kostenvorteil ein. Ab welchem NIR-Wert nachuntersucht wird, dürfte firmenintern durch Abwägung der Kosten gegen das Risiko entschieden werden.

3.2.2.2 Die Beurteilung der Güte der Kalibrierung bei Schwarzteeeproben mit Coffeingehalten < 0,1 %

Der Konzentrationsbereich der 390 entcoffeinerten Schwarzteeeproben um 0,1 % Coffein liegt zwischen 0,02 % und 0,15 % Coffein.

Tabelle 12: Vorhersagefehler von 390 unabhängigen entcoffeinerten Schwarzteeeproben < 0,1 % Coffein

RMSEP [% Coffein]	Mittelwert der unabh. Proben [% Coffein]	RMSEP bzgl. des Mittelwertes [%]
0,024	0,071	33,80

Auf den Mittelwert der untersuchten Proben bezogen beträgt der Vorhersagefehler RMSEP 33,80 % (Tab. 12).

Mit diesem hohen Fehler ist keine quantitative Bestimmung möglich. Die NIR-Methode ist demnach für die Bestimmung von Coffeingehalten um 0,1 % nicht geeignet. Da aber auch hier entscheidend ist, Proben zu erkennen, die den Grenzwert von 0,1 % Coffein

überschreiten, ist schließlich überprüft worden, ob die NIRS zumindest teilweise die HPLC-Analytik ersetzen kann.

Um zu ermitteln, ab welchem NIR-Wert der HPLC-Gehalt der Proben $\geq 0,1$ % Coffein beträgt, wurde die Quantifizierung der 390 unabhängigen Proben betrachtet. Bereits ab einem NIR-Wert von 0,06 % Coffein liegen die HPLC-Werte einiger Proben bei $\geq 0,1$ % Coffein. 83,8 % aller Proben weisen einen NIR-Wert von $\geq 0,06$ % Coffein auf. Eine Nachuntersuchung per HPLC aller Proben ab einem NIR-Wert von 0,06 % Coffein, würde weder eine Zeit- noch eine Kostenersparnis bedeuten (Abb. 25 und 26).

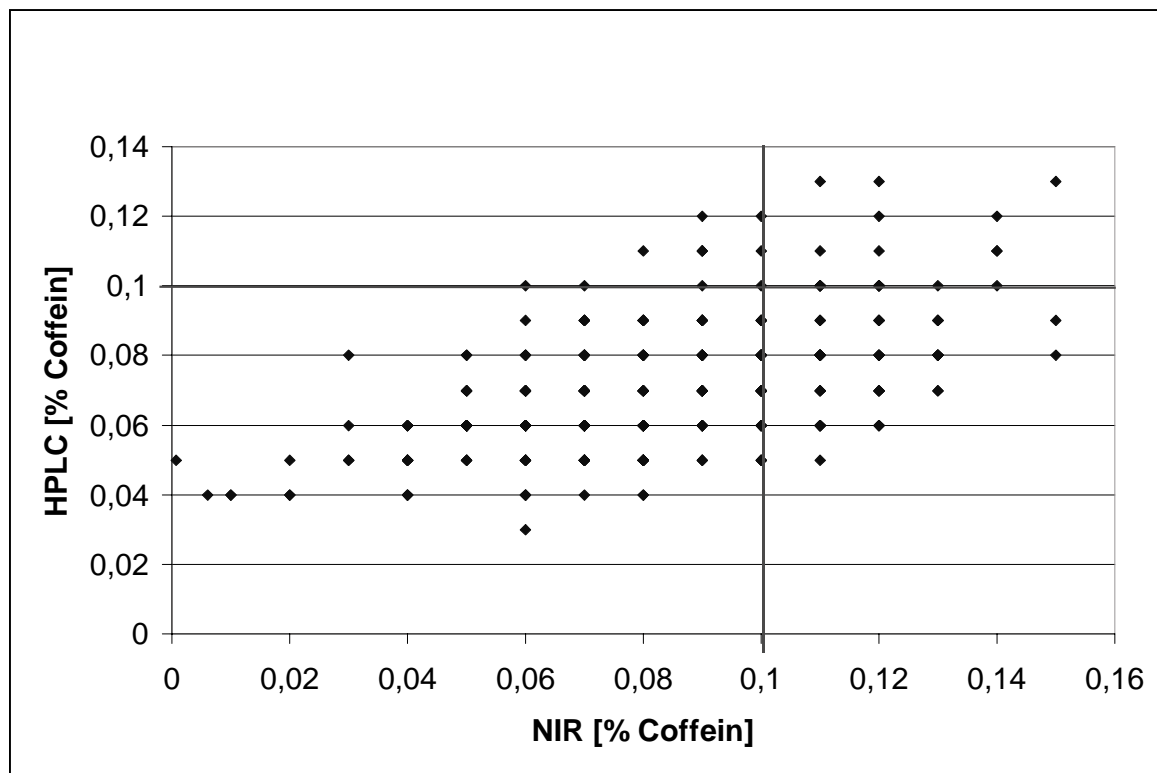


Abbildung 25: Die Differenzen zwischen der NIR-„Entcoff“-Methode und der HPLC-Referenzmethode im Laufe des Jahres 2000; Quantifizierung unabhängiger entcoffeiierter Schwarzteeeproben $< 0,1\%$ Coffein

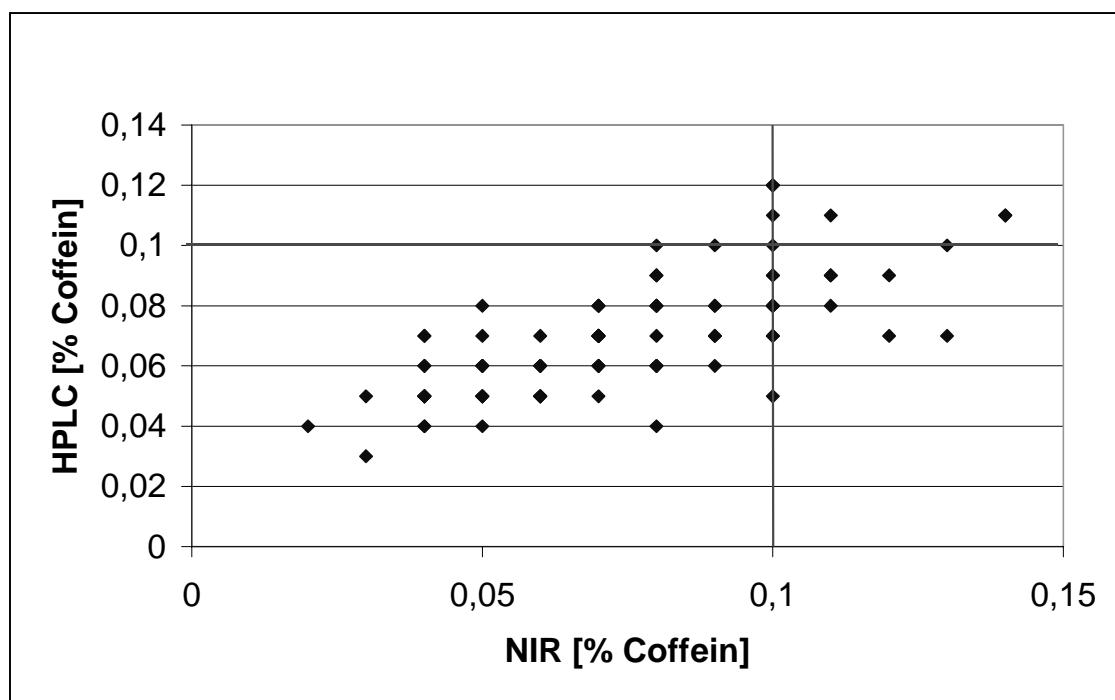


Abbildung 26: Die Differenzen zwischen der NIR-„Entcoff“-Methode und der HPLC-Referenzmethode im Laufe des Jahres 1999; Quantifizierung unabhängiger entcoffteinerter Schwarzteeeproben < 0,1 % Coffein

Von den 390 Mustern weisen mit der HPLC-Methode 11,03 % Coffeinwerte von $\geq 0,1$ % Coffein auf (Tab. 13).

Tabelle 13: Verteilung der Coffeingehalte der unabhängigen Schwarzteeeproben < 0,1 % Coffein bei HPLC und NIR

	Gesamt- proben	Proben mit HPLC $\geq 0,1$	Proben mit NIR $\geq 0,1$	Proben mit HPLC & NIR $\geq 0,1$	Proben mit HPLC $\geq 0,1$ & NIR $< 0,1$	Proben mit HPLC $< 0,1$ & NIR $\geq 0,1$
Anzahl	390	43	126	33	10	94
in %	100%	11,03%	32,31%	8,46%	2,56%	24,10%
in %		100%		76,74%	23,26%	

Davon wurden 76,7 % auch mit der NIR-Methode als überhöht bewertet. Etwa ein Viertel der laut HPLC überhöhten Proben wurden von der NIR-Analytik nicht erkannt und mit Gehalten $< 0,1$ % Coffein quantifiziert. Auf alle 390 Proben bezogen bedeutet dies jedoch, dass nur 2,56 % aller Proben in einem Zeitraum von 18 Monaten bei alleinigem Einsatz der NIRS in den Handel gelangt wären, die nicht der Kundenanforderung entsprochen hätten. Dabei sind 8,4 % der Proben korrekt als überhöhte Proben vom NIRS erkannt worden.

Bei vollständigem Ersatz der HPLC-Analytik durch die NIRS wären allerdings 32,31 % (= 126 Proben) dieser 390 Proben mit einem Wert von über 0,1 % Coffein als nicht der Spezifikation entsprechend ausgemustert worden. Mehr als 74 % dieser Proben (= 94 Proben insgesamt) weisen jedoch einen HPLC-Wert von weniger als 0,1 % Coffein auf, und hätten ohne weiteren Entcoffeinierungsschritt verkauft werden können.

Auch hier sollte demnach die HPLC zur Nachuntersuchung der laut NIRS überhöhten Proben eingesetzt werden.

Die NIRS stellt gegenüber der HPLC eine schnellere und zudem kostengünstigere Methode dar. Deshalb weist eine Reduzierung der HPLC-Untersuchungen von fast 70 % deutliche Vorteile auf. Nur 32,3 % der Proben, die laut NIR-Analytik nicht der Spezifikation von einem Coffeingehalt $< 0,1$ % Coffein entsprechen, müssen mit der HPLC nachuntersucht werden. Dabei wird dann aber akzeptiert, dass etwa 2,6 % der Proben nicht der Spezifikation entsprechen und somit unbemerkt in den Handel gelangen können.

Bei den 2,56 % der Proben, die von der NIR-Methode nicht als überhöhte Proben erkannt werden, liegen die NIR-Werte zwischen 0,06 % und 0,09 % Coffein. Um sicher zu stellen, dass nahezu alle überhöhten Proben erkannt werden, müssten alle Proben ab einem NIR-Wert von 0,06 % Coffein mit HPLC nachuntersucht werden. Da bei den 390 untersuchten Proben 83,8 % einen NIR-Wert von $\geq 0,06$ % Coffein aufweisen, wäre in diesem Fall die NIRS wenig vorteilhaft.

Ein Einsatz der NIRS bei der Bestimmung der Restcoffeingehalte von 0,1 % Coffein ist aufgrund hoher Fehlergrenzen nicht möglich. Wird aber auf die Bestimmung des exakten Coffeingehaltes verzichtet und stattdessen eine Prüfung der Proben auf Einhaltung des geforderten Grenzwertes von 0,1 % Coffein vorgenommen, kann die NIRS eingesetzt werden. Das Risiko, dass überhöhte Proben unbemerkt in den Handel gelangen, liegt bei weniger als 3 %. Kann dieses Risiko akzeptiert werden, sollten alle überhöhten Proben der NIR-Methode mit der HPLC nachuntersucht werden, um nur die tatsächlich überhöhten Proben erneut zu entcoffeinieren.

3.3 Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in (nicht entcoffeiertem) Schwarztee

Bei nicht entcoffeiertem Schwarztee liegen die Coffeinkonzentrationen zwischen 1,46 % und 4,09 % Coffein gegenüber 0,4 % bzw. 0,1 % beim entcoffeierten Schwarztee.

Aufgrund des Einflusses der unterschiedlichen Matrizen des entcoffeierten und des nicht extrahierten Schwarztees dürfen auch hier zur Bestimmung des Coffeingehaltes nur nicht entcoffeierte Schwarztees in die Kalibrierung des NIRS aufgenommen werden.

Auch hier fungiert die HPLC als Referenzmethode zur Coffeinbestimmung (vgl. Kapitel 4.3.1), die zeitgleich mit den NIR-Messungen (vgl. Kapitel 4.4) durchgeführt wurde. Da das Probenaufkommen nicht entcoffeierte Schwarztees gering ist, ist die Beurteilung der Methode bezüglich ihrer Robustheit und Richtigkeit schwierig.

In die Kalibrierung wurden 145 Spektren aufgenommen, 37 weitere Spektren dienen als Testset zur unabhängigen Beurteilung der Methode. Diese beiden Probensätze sind in den folgenden Grafiken dargestellt (Abb. 27 und 28). Die Verteilung der Proben bzgl. ihres Gehaltsspektrums ist bei beiden Datensätzen gleich und weitestgehend homogen. Die Auswahl des Testsets, der geeigneten Datenvorbehandlung und der optimalen Frequenzbereiche geschah analog zu Kapitel 2.5 und 3.2.

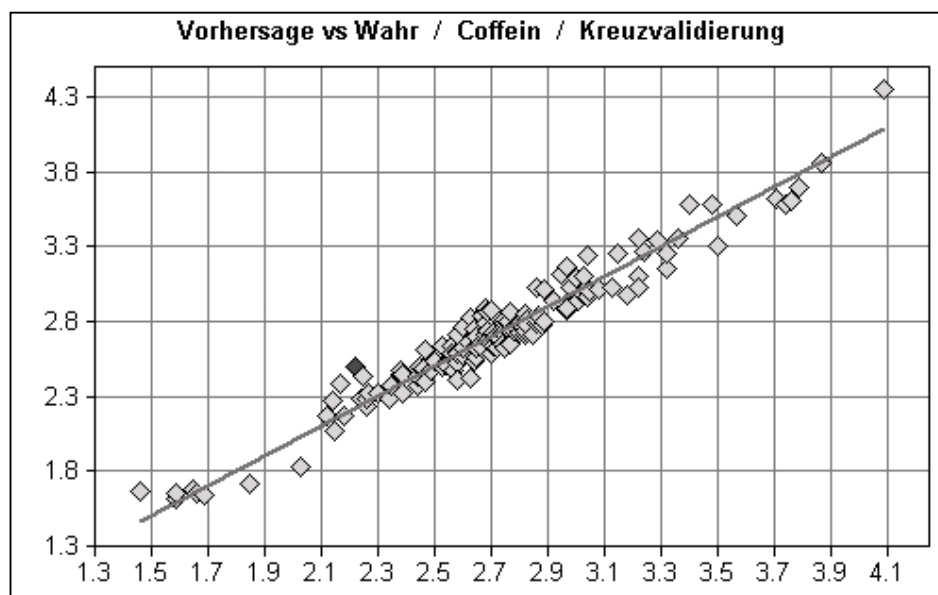


Abbildung 27: Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in nicht entcoffeiertem Schwarztee; Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse); NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

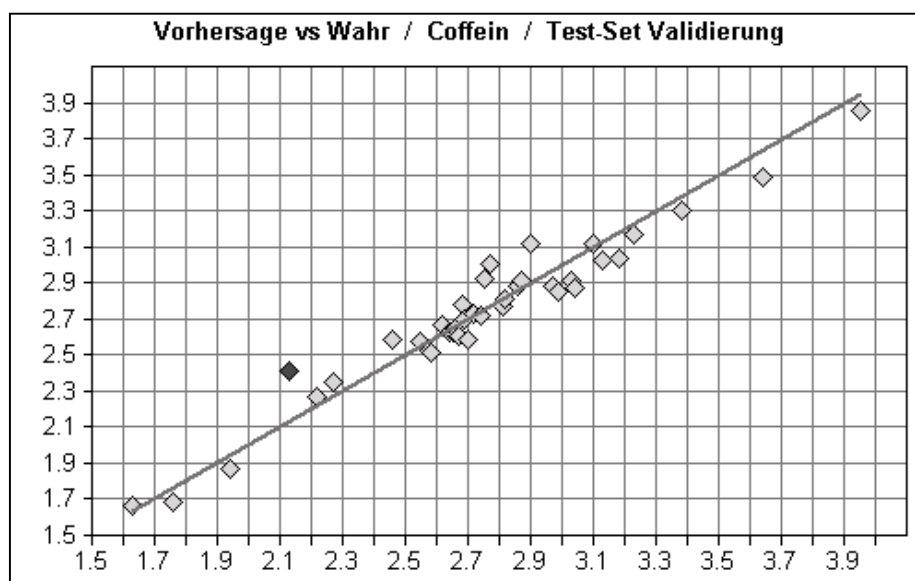


Abbildung 28: Testset zur Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in nicht entcaffiniertem Schwarztee; Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse); NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

Die Frequenzbereiche mit der besten Korrelation der Spektraldaten mit den Referenzdaten (Tab. 14) sind mit denen der „Entcaff“-Kalibration zur Restcoffeinbestimmung identisch (vgl. Tab. 8). Ausreißer sind nicht entfernt worden, da sich die Abweichungen aller Proben der Kalibrierung noch innerhalb der üblichen Differenzen zwischen den Referenzwerten und den NIR-Vorhersagen bewegen.

Tabelle 14: Statistische Parameter der Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in nicht entcaffiniertem Schwarztee

Datenvor- behandlung	Frequenz- bereiche [cm ⁻¹]	Anzahl Ranks	R ² [%] der Kalibration	RMSECV [% Coffein]	R ² [%] des Testsets	RMSEP [% Coffein]
MSC	6253 – 5396,7 4848,9 – 3822,8	7	96,09	0,123	95,88	0,111

Die besten Ergebnisse erzielen die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP bei Verwendung von sieben Ranks. Bei der Restcoffeinbestimmung sind 13 Ranks zur optimalen Quantifizierung notwendig. Dies kann durch die dort sehr niedrigen Analytgehalte erklärt werden.

Bei einem Mittelwert der Coffeinwerte von 2,74 % der Kalibration und 2,75 % des Testsets (Tab. 15) ist kein geringer Gehalt des Analyten gegeben, was durch die kleinere Anzahl an verwendeten Faktoren bereits deutlich wird.

Tabelle 15: Verteilung der Coffeingehalte der Schwarzteeeproben auf Kalibrationsset und Testset

Gehaltsspanne Kalibration [% Coffein]	Mittelwert Kalibration [% Coffein]	Gehaltsspanne Testset [% Coffein]	Mittelwert Testset [% Coffein]
1,46 – 4,09	2,74	1,63 – 3,95	2,75

145 Kalibrierproben stellen bei einer quantitativen NIR-Methode mit pflanzlichem Material eine sehr geringe Anzahl dar. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren vermessen und weisen dadurch bereits ein breites Spektrum bezüglich der Sortenvielfalt, der unterschiedlichen Klima- und Anbaubedingungen und Herkunftsländer auf.

Ein RMSEP von 0,104 % Coffein entspricht, auf den Mittelwert des Testsets bezogen, einer relativen Abweichung von 3,78 %. Die Richtigkeit der Methode ist damit erheblich höher als bei der Methode zur Coffeinbestimmung in entcaffiniertem Schwarztee. Ein Vorhersagefehler von weniger als 5 % vom Mittelwert des Testsets kann akzeptiert werden. Werden die Quantifizierungen der Referenzmethode mit denen der hier vorgestellten NIR-Methode verglichen, wird deutlich, dass die Differenzen der beiden Methoden in beide Richtungen gleichmäßig verteilt sind und in einem engen Bereich liegen (Abb. 29). Die Proben lassen auch keinen konzentrationsabhängigen Trend erkennen.

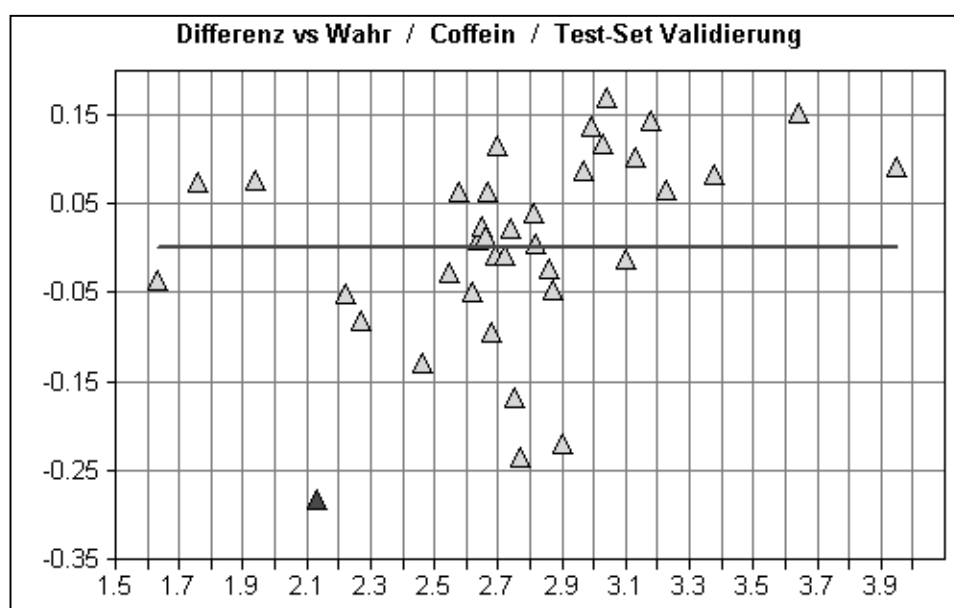


Abbildung 29: Testset der Kalibration zur Coffeinbestimmung in nicht entcaffiniertem Schwarztee; Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse); Differenzen [% Coffein] (NIR-Vorhersagen minus HPLC-Werte) (Y-Achse)

Das Testset besteht nur aus 37 Proben. Es ist also möglich, dass bei einer längeren Beobachtungsdauer und einem größeren Datensatz sich sowohl der Vorhersagefehler als auch die Abweichungen der Coffeinkonzentrationen zwischen der Referenz- und der NIR-Methode vergrößern. Aufgrund des geringen Probenaufkommens konnten leider keine ausführlicheren Beobachtungen der Kalibration durchgeführt werden.

Die Methode stellt prinzipiell ein stabiles, robustes Modell dar und bestimmt den Coffeingehalt mit einer Abweichung zu den Referenzwerten von weniger als 5 %. Eine endgültige Einstufung der Methode als „für den Routinebetrieb einsetzbar“ kann jedoch nicht vorgenommen werden.

3.4 Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

Bei den Hibiscusblütendrogen sind die qualitätsbestimmenden Merkmale der Gehalt an organischen Säuren und das Färbevermögen der Droge. Hibiscusdrogen sind, wie in der Einleitung beschrieben, vorwiegend in Fruchteeemischungen zu finden. Eingesetzt werden sie wegen ihrer Eigenschaft, den Teeaufguss rötlich zu färben und dem Getränk einen erfrischend-säuerlichen Geschmack zu verleihen. Um diese wertgebenden Eigenschaften der Hibiscusblüten schneller analysieren zu können, soll hier geprüft werden, ob die NIRS für diese Zwecke eingesetzt werden kann.

Die Referenzmethode (vgl. Kap. 4.3.3) zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen ist die Titration mittels 0,1 N NaOH-Maßlösung nach DAB 1997 [14]. Die Gehaltsbestimmung wurde nach der NIR-Messung an den Proben durchgeführt. Durch die ausführlichen Tests am entcoffeinierten Schwarztee waren die grundsätzlichen Bedingungen bei den Messungen am NIRS bereits gegeben (vgl. Kap. 4.4.7). Somit wurden alle Hibiscusdrogen auf eine Partikelgröße $\leq 0,2$ mm gemahlen und mit jeweils 16 Scans sechsmal vermessen. Das resultierende Mittelwertspektrum wurde schließlich für die NIR-Kalibrierung verwendet. Es wurden 517 Proben aus dem Probenaufkommen der Jahre 1998 bis 2000 verwendet, wobei der Großteil der Proben aus dem Jahr 1999 stammt.

Um eine möglichst robuste Methode zu erhalten, war es nötig, alle in diesen drei Jahren der Probensammlung aufgetretenen Variabilitäten mit in die Kalibrierung aufzunehmen. Somit blieb zur Beurteilung der 413 Proben umfassenden Kalibrierung ein unabhängiges Testset von 104 Proben.

Die Proben wurden nach steigendem Gehalt sortiert und jedes fünfte Spektrum dem unabhängigen Testset zugeordnet, die übrigen Proben wurden für die Kalibrierfunktion verwendet. Die Spektren mit dem höchsten und dem niedrigsten Gehalt verblieben in der Kalibrierung. Der Mittelwert der Konzentrationsdaten sollte bei beiden Probensätzen etwa gleich groß sein, um die Vergleichbarkeit der Datensätze zu gewährleisten. Dies ist hier der Fall (vgl. Tab. 16). Damit das Testset einem Datensatz, wie er später in der Routineanalytik auftritt, entspricht, wurde darauf geachtet, dass sowohl mehrere Anbaugebiete und Sorten als auch Proben aus den drei verwendeten Jahrgängen vertreten sind.

Zur Ermittlung der Frequenzbereiche und der Datenvorbehandlung, die die Korrelation der Konzentrations- mit den Spektraldaten am besten wieder gibt, wurden, wie im Falle der Coffeinmethoden beschrieben, mehrere Modelle über die Kreuzvalidierung und die Testset-Validierung berechnet und untereinander verglichen. Die Einstellungen der Methode mit dem geringsten RMSECV und RMSEP bei Verwendung einer möglichst geringen Anzahl an Faktoren werden dann als die geeigneten Parameter zur Bestimmung herangezogen. Zur Bestimmung des Säuregehaltes (berechnet als Citronensäure) in Hibiscusdrogen hat sich die Subtraktion einer geraden Linie als optimale Datenvorbehandlung der Spektren und der Frequenzbereich von 7503 cm^{-1} bis $4247,2\text{ cm}^{-1}$ als optimal erwiesen.

Proben werden bei der Berechnung der Kalibrierfunktion als „Ausreißer“ gekennzeichnet, wenn entweder die Differenz zwischen den Referenzwerten und den NIR-Vorhersagen wesentlich höher als üblich ist, oder die Mahalanobis Distanz des Spektrums deutliche Abweichungen zu den anderen Spektren der Kalibration zeigt. Acht Proben der Citronensäure-Kalibration wurden von der Software als Ausreißer gekennzeichnet. Bei vier Proben war die Abweichung der Konzentrationsdaten zwischen den beiden Methoden sehr hoch und dadurch auch der von der Software berechnete FValue-Wert. Das lässt auf eine fehlerhafte Referenzanalytik schließen. Bei weiteren vier Proben war die Mahalanobis Distanz erhöht, was auf spektrale Ausreißer hindeutet.

Die Wiederholung der Referenzanalytik dieser acht Proben ergab bei vier Proben andere Säuregehalte, bei den restlichen vier Proben wurden die ursprünglichen Titrationsergebnisse bestätigt. Nach der Korrektur der Referenzwerte und anschließender Neuberechnung der Kalibrierung zeigten die vier korrigierten Proben sowohl bei den FValue-Werten als auch bei den Differenzen zwischen Referenzwerten und NIR-Vorhersagen keine Auffälligkeiten mehr. Die übrigen vier Proben sind vermutlich „spektrale Ausreißer“. Bei Betrachtung der Spektren war bei drei der Ausreißer-Spektren ein Versatz der Spektren in Y-Richtung im Vergleich zu den anderen Proben erkennbar. Bei der Überprüfung der pulverisierten Proben, die zur Messung verwendet wurden, war ein größerer Partikeldurchmesser als bei den restlichen Proben erkennbar. Beim Sieben der Proben mit verschiedenen Sieblochgrößen, wurden bei diesen drei Proben Fraktionen mit einer Teilchengröße von über $0,2\text{ mm}$ gefunden. Die Fraktionen entsprachen 30 % – 42 % (G/G) der gesamten Proben. Diese drei Ausreißerproben sind offenbar mit einer anderen Mühle oder einer anderen Sieblochgröße vermahlen worden.

Nach Eliminierung dieser drei Ausreißer wurde erneut die Kalibrierung berechnet und die folgenden Ergebnisse erhalten (Tab. 16).

Tabelle 16: Parameter der Kalibration zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

	Anzahl Ranks	R ² [%]	RMSECV [% Citronensäure]	Gehaltsspanne [% Citronensäure]	MW Gehalt [% Citronensäure]
Kalibration	10	96,27	0,232	9,51 – 17,80	15,31
Testset	-	-	-	10,33 – 17,53	15,36

Von den ursprünglichen acht angezeigten Ausreißern konnte bei 3 Proben eine falsche Probenvorbereitung und bei vier Proben eine fehlerhafte Referenzanalytik als Grund für die hohen Mahalanobis Distanzen bzw. schlechten Vorhersagen gefunden werden. Bei der achten Ausreißerprobe bestätigte sich der Referenzwert. Die Probe zeigte bei der Überprüfung der Partikelgröße keine Auffälligkeiten und das Spektrum bestätigte sich ebenso bei der Wiederholung der NIR-Messung. Die Probe zeigt einen erhöhten Wert bei der Mahalanobis Distanz. Das bedeutet, dass sich das Spektrum von den anderen Kalibrierspektren deutlich unterscheidet. Da jedoch die Vorhersage des Säuregehaltes, mit den üblichen Abweichungen, gut mit dem Referenzwert übereinstimmt, wurde die Probe in der Kalibrierung belassen. Die Entfernung einer als Ausreißer angezeigten Probe aus dem Datensatz, ohne eingehende Prüfung, ist nicht zu empfehlen. Sie könnte zu einer Verfälschung der Kalibrierung führen.

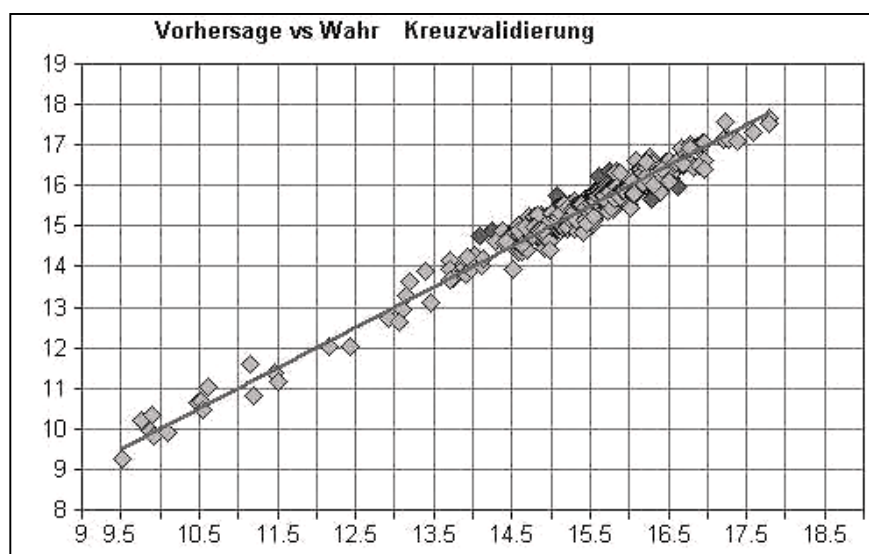


Abbildung 30: Kalibrierung zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen; Titrationwerte [% Citronensäure] (X-Achse); NIR-Vorhersagen [% Citronensäure] (Y-Achse)

Die homogene Verteilung der Konzentrationsdaten über den Arbeitsbereich ist aus Abbildung 30 zu ersehen. Ebenso ist zu erkennen, dass die Referenzdaten mit den NIR-Vorhersagen eine gute Übereinstimmung zeigen.

Der RMSECV der Kalibration und der RMSEP des Testsets (Tab. 17) sind bei fast identischen Mittelwerten der Gehaltsspannen (vgl. Tab. 16) etwa gleich groß und damit zwei wichtige Voraussetzungen für eine funktionierende Methode erfüllt. Bezogen auf den Mittelwert des Testsets entspricht der RMSEP von 0,228 % Citronensäure einer relativen Abweichung von 1,48 % (Tab. 17). Der Vorhersagefehler ist demnach sehr klein und dadurch ist die quantitative Bestimmung des Säuregehaltes (berechnet als Citronensäure) mit dem NIRS sehr genau möglich.

Tabelle 17: Statistische Parameter der Kalibration zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

Kalibration		Testset			
R ² [%]	RMSECV [% Citronensäure]	R ² [%]	RMSEP [% Citronensäure]	MW [% Citronensäure]	RMSEP auf den MW bezogen
96,27	0,231	95,73	0,228	15,36	1,48

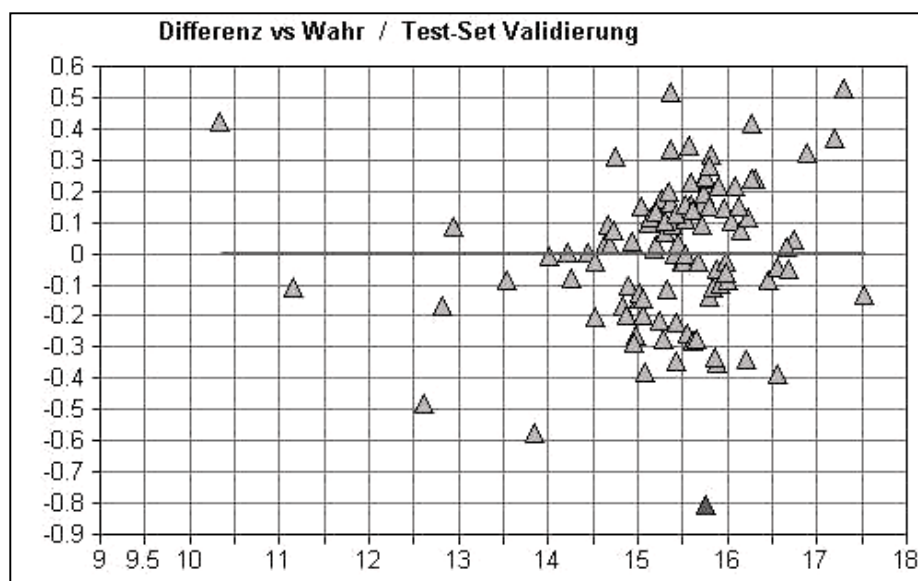


Abbildung 31: Testset zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen; Referenzwerte [% Citronensäure] (X-Achse); Differenzen [% Citronensäure] (NIR-Vorhersagen – Titrationswerte) (Y-Achse)

Wie aus Abbildung 31 zu entnehmen ist, sind die Differenzen der Konzentrationsdaten zwischen beiden Methoden durchweg gering. Die Abweichungen bewegen sich in beide Richtungen gleichmäßig und es ist kein Trend erkennbar. Da sowohl im Testset als auch in der Kalibration unterschiedlichste Einflüsse durch Verwendung von Proben verschiedener Anbaugelände, Sorten und Jahrgängen berücksichtigt wurden, kann die NIR-Methode als robust eingestuft werden. Schlechtere Ergebnisse sind im Routineeinsatz der Methode nicht zu erwarten, da der Kalibrierung alle Matrixveränderungen, die innerhalb von drei Jahren auftraten, bekannt sind.

Bei einer Sechsfach-Bestimmung des Säuregehaltes (berechnet als Citronensäure) von 40 Proben durch die Titration unter Wiederholpräzisionsbedingungen wird ein Variationskoeffizient von 0,33 % erzielt (Tab. 18). Die Sechsfachmessung der Proben mittels NIRS unter gleichen Bedingungen erzielte einen Variationskoeffizient von 0,38 %. Bezüglich der Präzision ist die NIRS in diesem Fall der Titration fast ebenbürtig.

Tabelle 18: Vergleich der Präzision der NIRS und der Titration zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

	Referenzmethode (Titration)	NIR-Methode
s [% Citronensäure]	0,051	0,058
MW [% Citronensäure]	15,28	15,35
VK [%]	0,33	0,38

Die Kalibrierung ist in der Routineanalytik einsetzbar, da die Methode bezüglich Robustheit, Präzision und Richtigkeit den geltenden Anforderungen entspricht.

Die Methode muß trotzdem gepflegt werden. Das bedeutet, dass die Kalibrierung ständig erweitert werden muß, damit sie an die jährlich wechselnden Bedingungen der Pflanzenmatrix angepasst ist.

3.5 Die Entwicklung einer NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen

Für die Kalibrierung zur Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusdrogen wurden die gleichen Spektren verwendet, die bereits bei der Bestimmung des Säuregehaltes eingesetzt wurden (vgl. Kap. 3.4). Die drei Proben, die auch größere Partikeldurchmesser als 0,2 mm aufweisen, sind hier nicht mit aufgenommen worden.

Die Ermittlung des Färbevermögens der Hibiscusdrogen erfolgte durch Absorptionsmessung bei 520 nm mit einem UV/VIS-Photometer nach Extraktion der Blüten mit siedendem Wasser (vgl. Kapitel 4.3.4).

Das Testset wurde wie bei den bereits vorgestellten Kalibrationen ausgewählt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass sowohl alle drei Jahrgänge der verwendeten Proben als auch alle Anbaugebiete und Hibiscussorten vertreten sind. Um dies zu gewährleisten, wurde an manchen Stellen von dem Verfahren abgewichen, jede fünfte Probe, nach steigenden Gehalten sortiert, dem Testset zuzuordnen. Als optimale Einstellung für die Datenvorbehandlung erwies sich hier die Vektornormierung und für die Frequenzen der Bereich von $6476,9\text{ cm}^{-1} - 5446,9\text{ cm}^{-1}$ und $4602,1\text{ cm}^{-1} - 4247,2\text{ cm}^{-1}$. Den niedrigsten RMSECV erhält das Modell bei der Kreuzvalidierung bei Verwendung von 12 Ranks. Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung und der Testset-Validierung sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Statistische Parameter der Kalibration zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen

Anzahl Ranks	R ² [%] der Kalibration	RMSECV [Abseinh.]	R ² [%] des Testsets	RMSEP [Abseinh.]
12	90,69	0,043	92,44	0,037

Die schlechte Korrelation der Vorhersagewerte des NIR mit den Referenzwerten bei der Kreuzvalidierung, die bereits aus dem Bestimmtheitsmaß R² ersichtlich ist, wird in Abbildung 32 noch verdeutlicht.

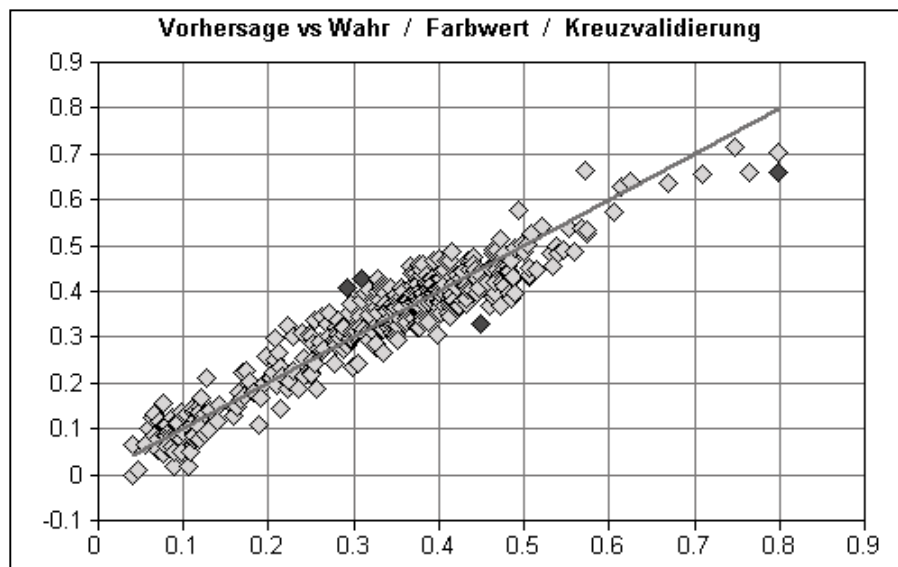


Abbildung 32: Kalibration zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [Absorptionseinheiten] (X-Achse) mit den NIR-
Vorhersagen [Absorptionseinheiten] (Y-Achse)

Die Vorhersage des Testsets zeigt ähnlich schlechte Ergebnisse. Die Differenz zwischen den Referenzdaten und den NIR-Werten ist bei sehr vielen Proben hoch (Abb. 33).

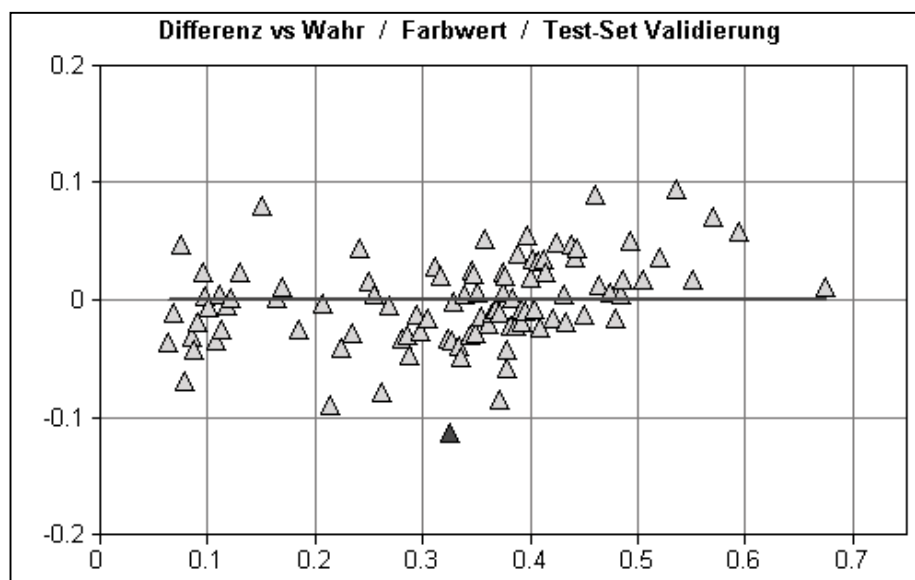


Abbildung 33: Testset zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen;
Referenzwerte [Absorptionseinheiten] (X-Achse); Differenzen
[Absorptionseinheiten] (NIR-Vorhersagen – Titrationswerte) (Y-Achse)

Dies drückt sich in hohen RMSEP- und RMSECV- Werten aus. Die Vorhersagefehler entsprechen, bezogen auf die Mittelwerte des Testsets 11,33 % (Tab. 20). Die Korrelation der Spektraldaten mit den Referenzdaten konnte auch durch Einsatz anderer Frequenzbereiche

oder Datenvorbehandlungen nicht verbessert werden. Ebenso erhöht sich der RMSECV bei Verringerung oder Erhöhung der Anzahl an verwendeten Faktoren der Methode.

Tabelle 20: Verteilung der Referenzwerte auf das Kalibrations- und Testset und der Vorhersagefehler RMSEP bei der Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen

Gehaltsspanne Kalibration [Abseinh.]	Mittelwert Kalibration [Abseinh.]	Gehaltsspanne Testset [Abseinh.]	Mittelwert Testset [Abseinh.]	RMSEP bzgl. Mittelwert [Abseinh.]
0,0330 – 0,7953	0,3291	0,0630 – 0,6800	0,3265	11,33

Aus den Abbildungen 32 und 33 ist auch ersichtlich, dass keine einzelnen Ausreißer für die hohen Werte der Vorhersagefehler verantwortlich sind. Eine Verbesserung der Kalibration durch Eliminierung begründeter Ausreißer ist hier nicht möglich. Die Ursache für die schlechten statistischen Ergebnisse und die geringe Korrelation der spektralen Daten mit den Referenzdaten können nicht auf fehlerhafte NIR-Messungen bzw. ungeeignete Messbedingungen zurückgeführt werden. Die Messbedingungen des NIRS, wie die Anzahl der verwendeten Scans, die Probenvorbereitung, etc., sind bei der Erstellung der Kalibrierung an entcoffeynierten Schwarztees ausführlich geprüft worden. Wären die Messparameter bei den Hibiscusdrogen ungeeignet oder fehlerhafte Messungen unter den Spektren, könnte die Methode zur Bestimmung des Säuregehaltes an Hibiscusdrogen nicht so gute Ergebnisse liefern. Die Ursache für die schlechten statistischen Ergebnisse müssen auf der Seite der Referenzmethode liegen. Einerseits könnten die Referenzmessungen fehlerhaft sein, andererseits kann die Referenzmethode an sich ungeeignet sein. Die Vielzahl der Proben, die hohe Differenzen zwischen den Referenzdaten und den NIR-Vorhersagen zeigen, deuten auf eine prinzipiell schlechte Referenzmethode hin. Wenn bereits die Bestimmung der Referenzwerte unpräzise Ergebnisse liefert, kann selbstverständlich auch die darauf aufbauende NIR-Methode nur schlechte Korrelationen der Daten zeigen.

Zunächst wurden die Referenzwerte auf fehlerhafte Messungen untersucht, indem bei 50 Proben, die eine hohe Differenz zwischen den beiden Methoden aufwiesen, erneut das Färbevermögen mittels photometrischer Messung ermittelt wurde. Bei der Doppel-Bestimmung der Proben traten starke Schwankungen auf. Der gemessene Absorptionswert des Photometers ist hier direkt das Endergebnis, da die Einwaage der Hibiscusdroge genau 1,000 g betragen soll. Bei diesen 50 Wiederholanalysen wurde die Einwaage exakt

eingehalten. Trotzdem wird ein durchschnittlicher Variationskoeffizient der Zweifachbestimmung der 50 Proben von 16,72 % erhalten (Tab. 21).

Tabelle 21: Vergleich der Präzision der Photometrie und der NIRS bei der Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusdrogen

	Standardabweichung s [Abseinh.]	Mittelwert [Abseinh.]	Variationskoeffizient [%]
Referenzmethode	0,042	0,2511	16,72 %
NIR-Methode	0,0220	0,2600	8,46 %

Der Variationskoeffizient der gleichen NIR-Bestimmung liegt nur bei etwa der Hälfte des Wertes der Referenzmethode. Die NIR-Methode ist wesentlich präziser für die Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusblüten.

Für die Analysen wurden stets Einwegküvetten verwendet. Um dies als Ursache für die starke Streuung auszuschließen, wurde folgender Versuch durchgeführt. Bei den Zweifachbestimmung von fünf Proben wurden die Analysen zuerst mit Einwegküvetten und anschließend die gleichen Proben mit einer standardisierten Glasküvette vermessen. Das Ergebnis ist folgender Grafik (Abb. 34) zu entnehmen.

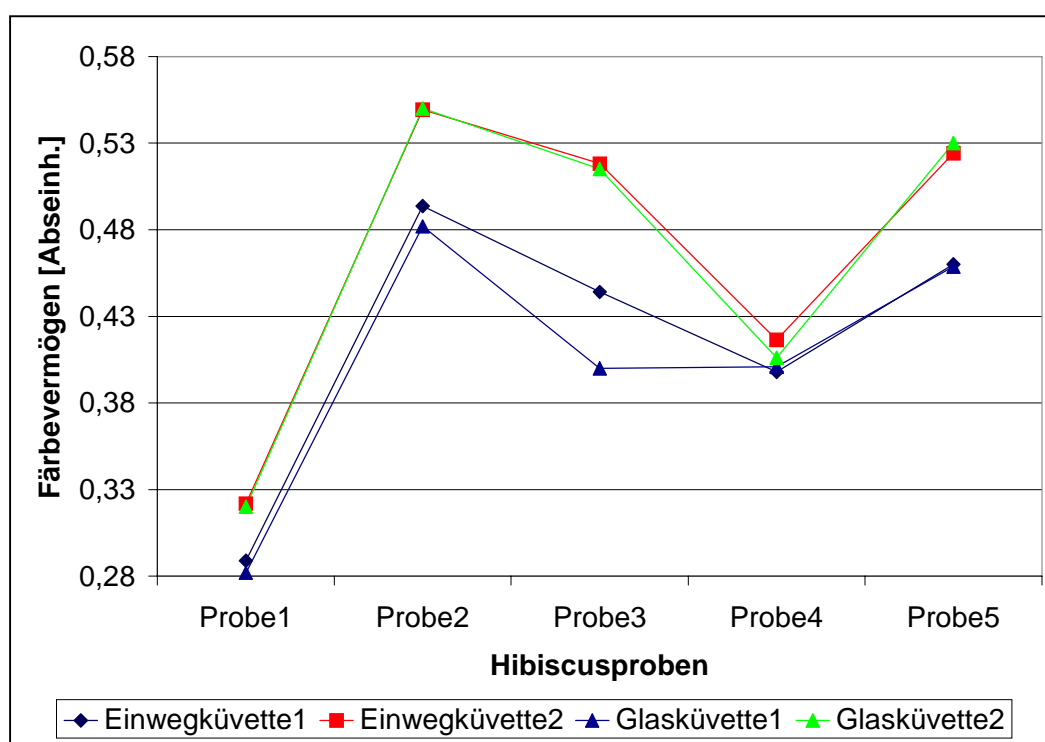


Abbildung 34: Darstellung der Abweichungen der Doppelbestimmungen bei Verwendung unterschiedlicher Küvetten (Nummerierung 1 und 2 bezieht sich auf Ansatz 1 bzw. 2 der Doppelbestimmung)

Die Absorptionseinheiten der einzelnen Bestimmungen mit der Glasküvette und der Einwegküvette stimmen weitgehend überein. Die beiden Werte des Zweifachansatzes differieren jedoch stark. Die Einwaage betrug bei beiden Bestimmungen genau 1,000g und die Ansätze wurden unter Wiederholpräzisionsbedingungen aufgearbeitet und vermessen. Bei einer Bestimmung der Wiederholpräzision der gleichen Probe wurde ein Variationskoeffizient von 12,19 % ermittelt. Da die Referenzwerte der 514 Kalibrier- und Testsetproben nicht unter Wiederholpräzisionsbedingungen ermittelt wurden, ist wohl bei den Referenzdaten ein noch größerer Variationskoeffizient enthalten. Da eine NIR-Methode den Fehler der Referenzmethode übernimmt, werden dadurch die hohen Vorhersagefehler RMSEP und RMSECV erklärbar. Die schlechte Korrelation des Spektraldatensatzes mit den Referenzdaten liegt in der unpräzisen Referenzmethode begründet. Die erstellte NIR-Kalibrierung erlaubt in der Routineanalytik die Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusdrogen mit einem Vorhersagefehler von etwa 11 %. Durch die geringe Präzision der bisher eingesetzten photometrischen Bestimmung waren die Bestimmungen bisher bereits mit einem hohen Fehler behaftet. Deshalb sollte in Erwägung gezogen werden, stattdessen die NIRS einzusetzen. Der Fehler ist durch die Fehlerfortpflanzung bei der NIR-Analytik, im Vergleich zur Referenzanalytik, immer etwas erhöht. Es ist bei der Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusdrogen jedoch nicht erforderlich, exakte Werte zu bestimmen. Zudem weist die NIRS durch die Kosten- und Zeitersparnis deutliche Vorteile auf. Die Richtigkeit der NIR-Analytik sollte mit der Präzision der Referenzanalytik steigen. Deshalb sollte zunächst die photometrische Bestimmung überprüft und gegebenenfalls überarbeitet werden.

3.6 Die Entwicklung der NIR-Kalibrierungen zur Bestimmung ausgewählter Inhaltsstoffe in Grüntee

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit, die an der TU Braunschweig durchgeführt wurde [64], waren bereits aus 95 Grüntee-Proben Kalibrierungen für Coffein, Theobromin, Theogallin, Gallussäure, Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epigallocatechingallat entwickelt worden. Die erhaltenen Ergebnisse waren erfolgversprechend. Deswegen sollte überprüft werden, ob der Einsatz der NIRS zur Bestimmung des Catechingehaltes sowie weiterer der oben genannten Inhaltsstoffe im Routinebetrieb eines Labors möglich ist.

Bei der Entwicklung der Methode zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes in entcoffeiniertem Schwarztee wurde bereits aufgezeigt, dass eine Kalibrierung unter Verwendung von 145 Proben nicht den Anforderungen im Routinebetrieb gerecht werden kann. Methoden, die nur auf 95 Proben basieren, können die gesamte Variabilität einer Pflanzenmatrix nicht erfassen. Es wurden deshalb 483 Proben zur Erstellung der nachfolgend beschriebenen Kalibrierungen verwendet (vgl. Kap. 4.4.9). Die verwendeten Grüntees stammen von entcoffeinierten und nicht entcoffeinierten Grüntees, die innerhalb von vier Jahren bei der Grüntee-Produktion der Fa. Plantextrakt anfielen. Sie umfassen daher fast alle Sorten und Anbaugebiete, die in diesem Zeitraum verarbeitet wurden. Dadurch sollte dem Anspruch einer robusten Methode, die aufgrund der großen Variabilität einer Pflanzenmatrix besteht, Rechnung getragen werden.

Als Referenzmethode wurde die HPLC verwendet (vgl. Kapitel 4.3.2). Die Proben sind etwa zeitgleich mit der HPLC und dem NIRS vermessen worden. Die Grüntees sind mit einer HPLC-Methode analysiert worden, bei der Theobromin und Coffein als Referenzsubstanzen verwendet wurden. Die Methode war, bei deren Einsatz als Referenzmethode für die NIRS, bereits im Routinebetrieb der Fa. PhytoLab etabliert.

Die Grüntee-Muster wurden zunächst mit der Zentrifugalmühle auf eine Partikelgröße von $< 0,2$ mm vermahlen, mit dem Nah-Infrarot-Spektrometer vermessen und mittels HPLC analysiert.

Jede Probe wurde mit dem NIRS sechsmal vermessen, und von den erhaltenen sechs Spektren das Mittelwertspektrum berechnet. Die Mittelwertspektren wurden zusammen mit den durch die HPLC ermittelten Analytkonzentrationen in die Kalibrierungen aufgenommen.

Von den insgesamt 483 Grünteeproben wurde aus 386 Proben die Kalibrierfunktion berechnet, die 97 verbleibenden Proben bilden das unabhängige Testset, das zur Beurteilung der Güte der Methode dient. Die Kalibrierungen wurden auf Ausreißer geprüft und insgesamt 3 Proben als Ausreißer identifiziert und entfernt. Bei diesen Grüntees war bei der Kreuzvalidierung die Differenz zwischen den Referenzwerten und den NIR-Vorhersagen, bei allen analysierten Substanzen, etwa doppelt so hoch als bei den anderen Kalibrierspektren. Der FValue-Wert und die Mahalanobis Distanz dieser Muster waren, im Vergleich zu den anderen Proben, bei allen Kalibrierungen stark erhöht. Das ließ darauf schließen, dass die NIR-Messungen fehlerhaft waren.

Beim optischen Vergleich der Ausreißer-Spektren mit den Kalibrierspektren konnte dies bestätigt werden. Die Mittelwertspektren enthielten offenbar Einzelmessungen, bei denen der Probenbecher nicht exakt in den Rotator über der Integrationskugel eingerastet war. Dadurch wurde der Probenbecher mit der Probe in Schräglage gedreht und vermessen. Das Resultat waren im Aussehen völlig veränderte Einzelspektren, die aber bei den Mittelwertspektren, durch die Mittelung mit fünf korrekt entstandenen Spektren, optisch nicht sofort erkennbar waren. Durch die Mahalanobis Distanz, die bei der Kalibrierung von jedem Spektrum berechnet wird, sind auch solche Fehlmessungen erkennbar. Nach der Entfernung dieser Grüntees aus dem Kalibrierset konnten keine weiteren Proben mehr als Ausreißer identifiziert werden.

Mit der Nah-Infrarot-Spektroskopie ist es prinzipiell möglich, mehrere Komponenten gleichzeitig zu bestimmen. Bei der Ermittlung der Frequenzbereiche und der Datenvorbehandlung, bei der die Korrelation der Spektraldaten mit den Konzentrationsdaten am höchsten ist, wurde jedoch festgestellt, dass für jeden zu untersuchenden Inhaltsstoff andere Parameter optimal sind. Deshalb wurde für jede Substanz eine eigene Kalibrierung berechnet. In Tabelle 22 sind die Einstellungen aufgezeichnet, die den geringsten RMSECV bei der Kreuzvalidierung der Methoden, mit der geringsten Anzahl an PLS-Faktoren, ergeben haben.

Tabelle 22: Parameter der Kalibrationen der untersuchten Inhaltsstoffe des Grüntees, Kalibrierung enthält entcoffeierte und nicht entcoffeierte Grüntees; (VN = Vektornormierung; MSC = Multiple Scatter Correction; Min.-Max.-N. = Min-Max-Normierung; 1. Abl. = 1. Ableitung)

Substanz	Datenvor- behandlung	Frequenzen [cm ⁻¹]	R ² (Kreuz- validierung) [%]	RMSECV [%]	Anzahl PLS- Faktoren
Theogallin	Min-Max-N.	6106,5 - 4243,3	92,02	0,106	8
Gallussäure	VN	10002,5 - 7499 & 4602 - 4247,1	86,51	0,012	9
Theobromin	VN	6102,6 - 5446,8 & 4602 - 4247,1	92,42	0,009	13
EGC	1. Abl. & VN	6102,7 - 4247,2	91,77	0,19	11
ECG	1. Abl. & MSC	7506,7 - 5442,9 & 4605,9 - 4243,3	93,19	0,184	8
EGCG	1. Abl. & MSC	6102,6 - 4598,2	95,46	0,342	10
Epicatechin	1. Abl. & MSC	7506,7 - 5442,9 & 4605,9 - 4243,3	91,82	0,081	10
Catechin	1. Abl. & VN	7506,7 - 4247,1	90,37	0,025	10
Coffein	VN	6253,1 - 5392,9 & 4849 - 3819	99,03	0,105	9

Es wurde darauf geachtet, dass im Testset möglichst jedes Anbaugebiet und jede Sorte vertreten sind, die in diesen vier Jahren auftraten. Ebenso wichtig ist die Übereinstimmung der Mittelwerte der Konzentrationsdaten der Kalibrierung und des Testsets. Sind diese Bedingungen erfüllt und ist die Gehaltsspanne der Kalibration größer als die des Testsets, kann das Testset zur Beurteilung der Kalibration herangezogen werden und eine Aussage über die Robustheit und Richtigkeit der NIR-Bestimmungen getroffen werden.

Die optimale Anzahl an PLS-Vektoren (Ranks), mit der das Modell weder über- noch unterbestimmt ist, wurde ebenfalls über den geringsten RMSECV bei der Kreuzvalidierung ermittelt.

Am Beispiel der Catechin-Kalibration (Abb. 35) lässt sich gut erkennen, dass der RMSECV bei der geeigneten Anzahl an PLS-Faktoren ein Minimum durchläuft. In diesem Fall hat die Software die Verwendung von acht Ranks vorgeschlagen, da sich der Vorhersagefehler im Vergleich zu neun Ranks nur noch gering verändert. Die Quantifizierung des Testsets hat aber bei Einsatz von neun Ranks bessere Übereinstimmungen mit den Referenzwerten erbracht. Deshalb wurden bei der Methode zur Bestimmung des Catechingehaltes im Grüntee neun Ranks verwendet.

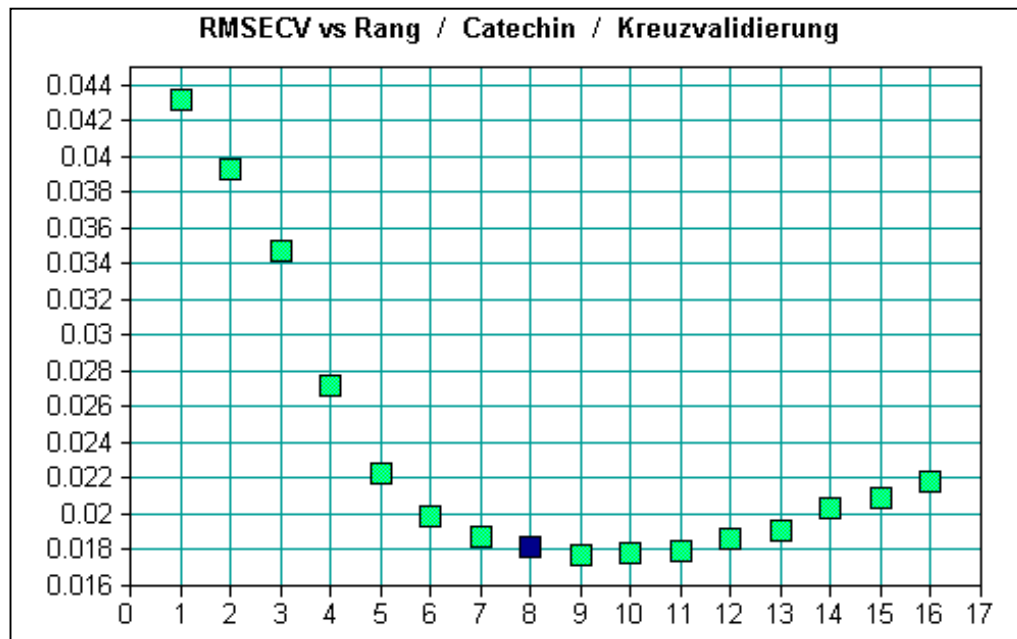


Abbildung 35: Kreuzvalidierung der Catechin-Gesamt-Kalibration; Gegenüberstellung des Vorhersagefehlers RMSECV [% Catechin] gegen die Anzahl PLS-Faktoren (Ranks); Blau: von der Software vorgeschlagener Wert für die Analytik

Zur Beurteilung der Kalibration dient einerseits die Prüfung, ob die Proben des Testsets, die von unterschiedlichen Anbaugebieten und Sorten stammen, zuverlässig bestimmt werden können. Andererseits soll die Richtigkeit der NIR-Bestimmung im Vergleich zur Referenzmethode beurteilt werden. Der Vorhersagefehler soll, auf den Mittelwert der Analytkonzentrationen im Testset bezogen, nicht höher als 10 % liegen. Ein höherer Fehler bedingt eine zu große Ungenauigkeit. Ebenso soll die Präzision der NIR-Methoden mit der HPLC-Methodik verglichen werden, um festzustellen, welche Analytik eine geringere Streuung der Einzelmessungen aufweist.

Diese Beurteilungen müssen zunächst für jeden Inhaltsstoff des Grüntees getrennt voneinander betrachtet werden.

3.6.1 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Catechingehaltes in Grüntee

Die Spektren wurden für die Kalibrierung zur Bestimmung des Catechingehaltes der Vektornormierung unterzogen und anschließend die erste Ableitung berechnet. Mit dieser Kombination der Datenvorbehandlungen wurden die besten Ergebnisse für die Kalibrierfunktion erreicht. Der für die Bestimmung geeignete Frequenzbereich von $7506,7 \text{ cm}^{-1} - 4247,1 \text{ cm}^{-1}$ schließt hier die Wasserbande zwischen 5000 cm^{-1} und 5300 cm^{-1} mit ein. Bei Ausschluß dieses Bereiches verschlechterten sich die statistischen Parameter der Methode ebenso wie bei Verwendung anderer Frequenzbereiche. Dadurch kann der Wassergehalt der Proben Einfluss auf die Quantifizierung des Catechins mit der NIRS nehmen.

Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden zwei Proben, die nicht in der Kalibrierung enthalten waren, auf unterschiedliche Feuchtigkeitsgehalte eingestellt und mit dem Nah-Infrarot-Spektrometer vermessen und mit der Catechin-Kalibration quantifiziert. Ein Teil der Proben wurde mit Wasser besprüht und über Nacht in einem verschließbaren Kunststoffbeutel aufbewahrt. Nach der NIR-Messung dieser Proben wurden sie zur Ermittlung des Trocknungsverlustes (TV) im Trockenschrank bei $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Trocknungsverlust bei Probe 1 betrug 10,15 %, bei Probe 2 betrug er 9,93 % (Tab. 23 und Tab. 24).

Ein anderer Teil der Proben wurde im Trockenschrank eine Stunde getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und mit dem NIRS vermessen. Dadurch war der Feuchtigkeitsgehalt der ursprünglichen Grünteeprobe etwas verringert. Nach der NIR-Messung wurde, auf die gleiche Weise wie oben beschrieben, der TV mit 2,3 % bei Probe 1 und 1,96 % bei Probe 2 bestimmt. Die Quantifizierung der NIR-Messungen wurden mit der NIR-Vorhersage der ursprünglichen Grünteemuster, mit einem TV von 5,5 % (Probe 1) bzw. 5,1 % (Probe 2), und dem HPLC-Wert der Probe, verglichen (Tab. 23 und Tab. 24).

Tabelle 23: Einfluss des Trocknungsverlustes (TV) auf den mittels NIRS bestimmten Catechingehalt

	HPLC [% Catechin]	NIR [% Catechin] bei TV=5,50 %	NIR [% Catechin] bei TV=10,15%	NIR [% Catechin] bei TV=2,30 %
Grüntee 1	0,2040	0,1888	0,1904	0,1982

Tabelle 24: Einfluss des Trocknungsverlustes (TV) auf den mittels NIRS bestimmten Catechingehalt

	HPLC [% Catechin]	NIR [% Catechin] bei TV=5,10 %	NIR [% Catechin] bei TV=9,93 %	NIR [% Catechin] bei TV=1,96 %
Grüntee 2	0,1108	0,0942	0,1248	0,1112

Den Tabellen 23 und 24 kann entnommen werden, dass der TV der Proben wenig Einfluss auf die Quantifizierung bei den Grüntees hat. Der Catechingehalt der NIR-Vorhersagen korreliert nicht mit den Wassergehalten der Proben.

Die Standardabweichung der Messungen der beiden Grünteeproben bei unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehalten ergibt bei Probe 1 einen Wert von 0,015 % Catechin und einen Variationskoeffizienten von 13,9 %. Die Werte für die Probe 2 sind mit 0,005 % Catechin für die Standardabweichung und 2,6 % (VK) noch geringer. Die Streuung dieser Messungen liegen im Bereich der üblichen Streuung der Messungen dieser NIR-Methode. Die Standardabweichung, die bei der Ermittlung der Präzision der Methode berechnet wurde, liegt bei 0,0149 % Catechin (Tab. 27) und der Variationskoeffizient bei 14,12 %. Die Abweichungen der NIR-Meßwerte liegen demnach im üblichen Bereich der Streuung der Messungen und stammen nicht von den unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehalten der Proben.

Da die Kalibrationsproben unterschiedliche Trocknungsverluste aufweisen, sind in diesem Modell offensichtlich genügend Varianzen des Feuchtigkeitsgehaltes vorhanden, um zu gewährleisten, dass dies bei der Bestimmung des Catechingehaltes keine große Rolle spielt.

Außerdem wurde bei der Ermittlung der Referenzdaten darauf verzichtet, die Analytkonzentrationen auf den TV bezogen anzugeben (vgl. Kap. 4). Alle hier verwendeten Referenzwerte sind nicht auf den TV bezogen und sind dadurch unabhängig vom Wassergehalt der Grüntees. Das NIR-Modell kann demnach, auch ohne Ausschluß der Wasserbande, bei der Wahl der Frequenzbereiche zuverlässig den Gehalt an Catechin im Grüntee ermitteln.

Aus Tabelle 25 ist ersichtlich, dass der Mittelwert der Catechinkonzentrationen der Kalibration und des Testsets zwar gut übereinstimmen und auch der Konzentrationsbereich der Kalibrierung weiter gefasst ist als beim Testset, die Gehalte generell aber sehr niedrig sind. Bei durchschnittlichen Catechinkonzentrationen von 0,13 % ist die gleiche Problematik des niedrigen Analytgehaltes wie bei den entcoffinierten Schwarztees gegeben.

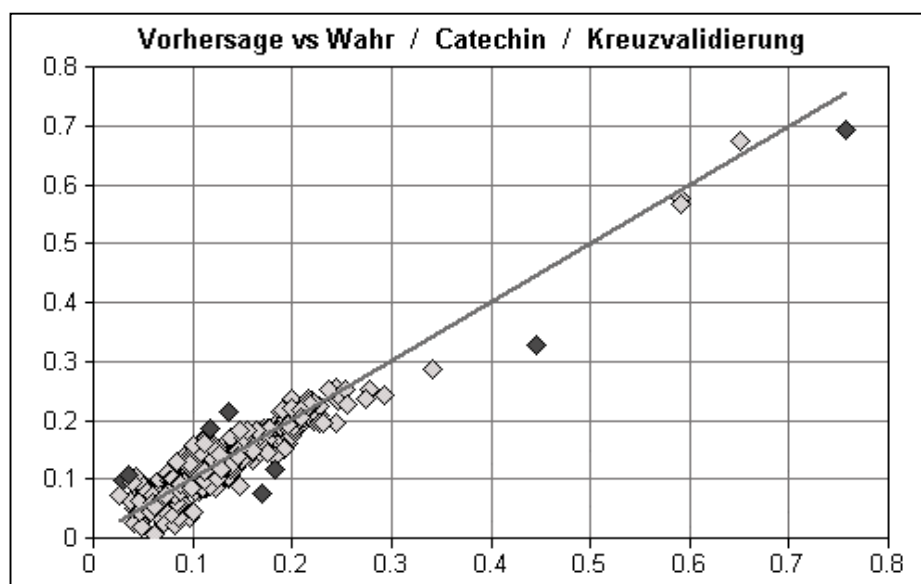
Tabelle 25: Verteilung der Catechinkonzentrationen auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Catechin]	Mittelwert der Referenzwerte [% Catechin]
Kalibrierung	0,027 0– 0,7574	0,1325
Testset	0,0370 – 0,6418	0,1342

Aus Tabelle 26 wird ersichtlich, dass das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 10 PLS-Faktoren nur gering über dem geforderten Mindestmaß von 90 % liegt. Dies liegt daran, dass der große Teil der Kalibrierproben im engen Konzentrationsbereich von 0,027 % – 0,29 % Catechin liegt und nur sehr wenige Proben den großen Bereich darüber abdecken (Abb. 36). Da auch beim Testset die Proben auf ähnliche Weise verteilt sind, ist auch hier das Bestimmtheitsmaß entsprechend gering (Abb. 37 und Tab. 26). Die geringen Werte der Bestimmtheitsmaße bedeuten, dass ein relativ großer Teil der Varianz der Spektraldaten und der Referenzdaten nicht durch das Modell erklärt werden kann.

Tabelle 26: Statistische Parameter der Kalibration zur Bestimmung des Catechingehaltes in Grüntee

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% Catechin]	R^2 [%]	RMSEP [% Catechin]	MW [% Catechin]	RMSEP auf den MW bezogen
90,37	0,025	87,56	0,029	0,1342	21,61 %

**Abbildung 36: Gesamtkalibration zur Bestimmung von Catechin; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Catechin] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Catechin] (Y-Achse)**

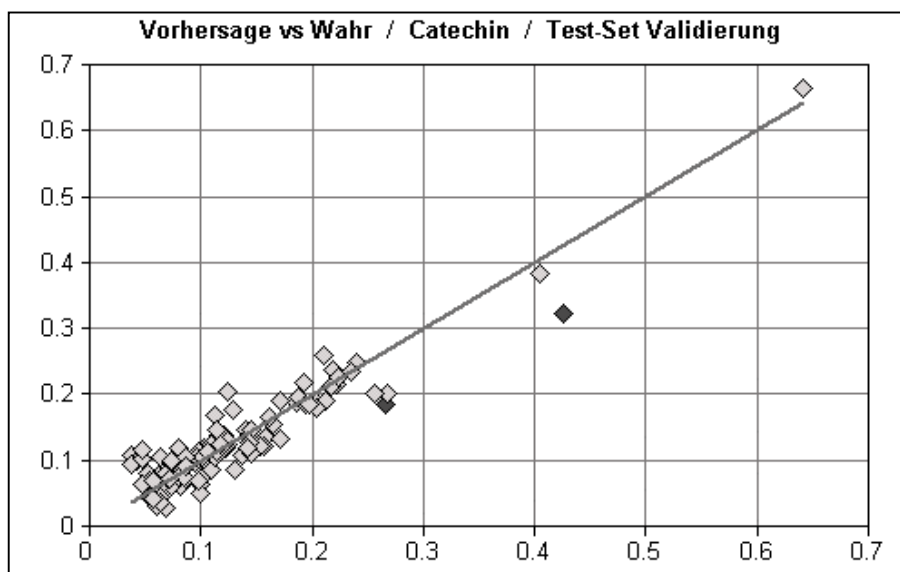


Abbildung 37: Testset zur Bestimmung von Catechin; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Catechin] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Catechin] (Y-Achse)

Deutlich wird dies, wenn die Vorhersagefehler betrachtet werden. Der Fehler der Kalibration stimmt relativ gut mit dem des Testsets überein (Tab. 26). Die Vorhersagefehler sind jedoch bei diesen niedrigen Konzentrationen sehr hoch. Auf den Mittelwert der Catechingehalte des Testsets bezogen, bedeutet ein RMSEP von 0,029 % Catechin einen Vorhersagefehler von 21,61 %. Diese Ungenauigkeit kann bei einer quantitativen Bestimmung nicht akzeptiert werden. Das Modell kann auch durch die Eliminierung von Ausreißern nicht verbessert werden. Die Proben, die eine größere Abweichung zwischen den Referenz- und den NIR-Daten bei der Kalibrierung aufweisen sind keine echten Ausreißer. Die Mahalanobis Distanz dieser Spektren und damit auch deren FValue-Wert sind nicht wesentlich erhöht. Damit können Fehler bei der NIR-Messung ausgeschlossen werden. Auch die Referenzdaten der entsprechenden Proben konnten mehrfach bestätigt werden. Deshalb dürfen diese Spektren nicht aus der Kalibrierung genommen werden.

Bei der Ermittlung der Präzision wurde die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der sechs NIR-Einzelmessungen von 40 Grünteeproben ermittelt und mit dem Variationskoeffizient der Referenzmethode verglichen (Tab. 27).

Tabelle 27: Präzision der Catechinbestimmung mittels NIRS im Vergleich zur HPLC

s [% Catechin]	MW [% Catechin]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0149	0,1169	14,12	12,69

Die Streuung der Einzelmessungen ist bei der Bestimmung des Catechingehaltes mittels NIRS höher als mit der Referenzmethode HPLC. Die NIR-Methode ist somit unpräziser als die HPLC-Methode.

Die Robustheit der Methode kann über die Abweichungen der beiden Methoden bei den Testsetproben ermittelt werden (Abb. 38). Eine Differenz mit negativen Vorzeichen bedeutet, dass der NIR-Wert über dem HPLC-Wert liegt und umgekehrt. Bei den hohen Konzentrationswerten kann demnach festgestellt werden, dass die NIR-Vorhersagen deutlich niedriger als die HPLC-Bestimmungen ausfallen. Bei den niedrigen Catechinkonzentrationen weisen die Differenzen vermehrt negative Vorzeichen auf und die Abweichungen sind im negativen Bereich höher als im positiven. Das bedeutet, dass bei niedrigen Catechinkonzentrationen die NIR-Werte meist über den Referenzwerten liegen. Es kann aber aufgrund der wenigen hohen Konzentrationswerte und der großen Streuung der Werte, die durch den hohen Vorhersagefehler verursacht wird, nicht von einem Trend ausgegangen werden. Zur Bestimmung des Catechingehaltes im Grüntee ist die NIRS - Methode jedoch aufgrund der großen Ungenauigkeit nicht einsetzbar.

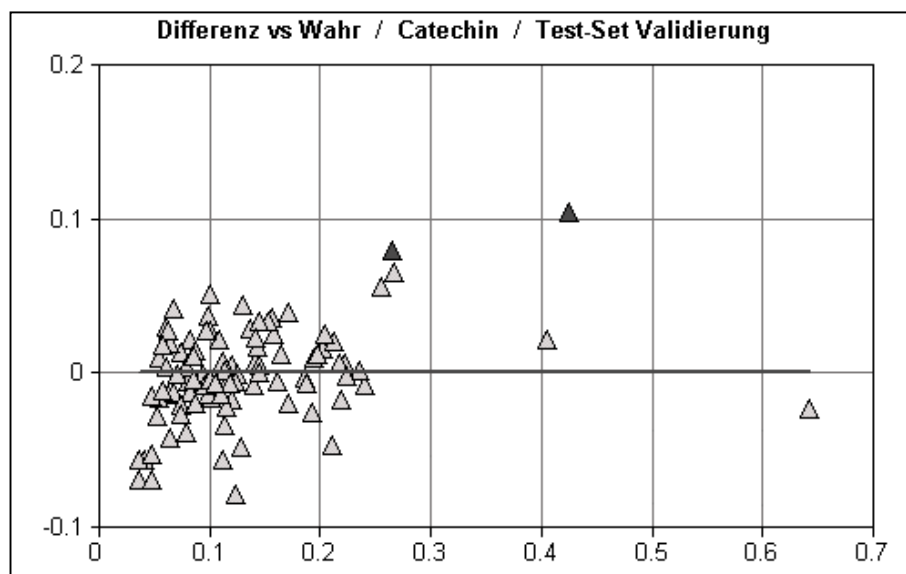


Abbildung 38: Testset zur Bestimmung von Catechin; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Catechin] (X-Achse) und der Differenzen (NIR-Vorhersagen – HPLC-Werte) [% Catechin] (Y-Achse)

3.6.2 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epicatechingehaltes in Grüntee

Von den verwendeten Spektren wurden nach der MSC als Datenvorbehandlung die 1. Ableitungen berechnet und diese dann in die Kalibrierung eingebracht. Die verwendeten Frequenzbereiche schließen die Wasserbande aus, und können Tabelle 22 entnommen werden. Tabelle 28 zeigt, dass der Mittelwert der Epicatechinkonzentrationen der Kalibration und des Testsets gut übereinstimmen und auch der Konzentrationsbereich der Kalibrierung weiter gefasst ist als beim Testset. Die Gehalte liegen mit Mittelwerten von 0,5544 % für die Kalibration und 0,5757 % für das Testset deutlich höher als beim Catechin.

Tabelle 28: Verteilung der Epicatechinkonzentrationen auf Testset und Kalibration

	Konzentrationsspanne [% Epicatechin]	Mittelwert der Referenzwerte [% Epicatechin]
Kalibrierung	0,066 – 2,797	0,5544
Testset	0,067 – 2,652	0,5757

Bei Verwendung von 10 PLS-Faktoren liegt das Bestimmtheitsmaß R^2 mit 91,82 % über dem Mindestmaß von 90 %. Die Kalibrierproben liegen hauptsächlich in zwei Bereichen. Ein Teil der Proben ist im Bereich von weniger als 0,2 % Epicatechin und der andere Teil zwischen 0,4 % und 1,2 % Epicatechin zu finden (Abb. 39). Nur drei Proben liegen im hohen Konzentrationsbereich über 2 % Epicatechin. Bei diesen Proben sind die Spektren und die Referenzdaten überprüft und keine Fehlmessungen gefunden worden. Sie sind nicht als Ausreißer identifiziert worden und verbleiben in der Kalibration.

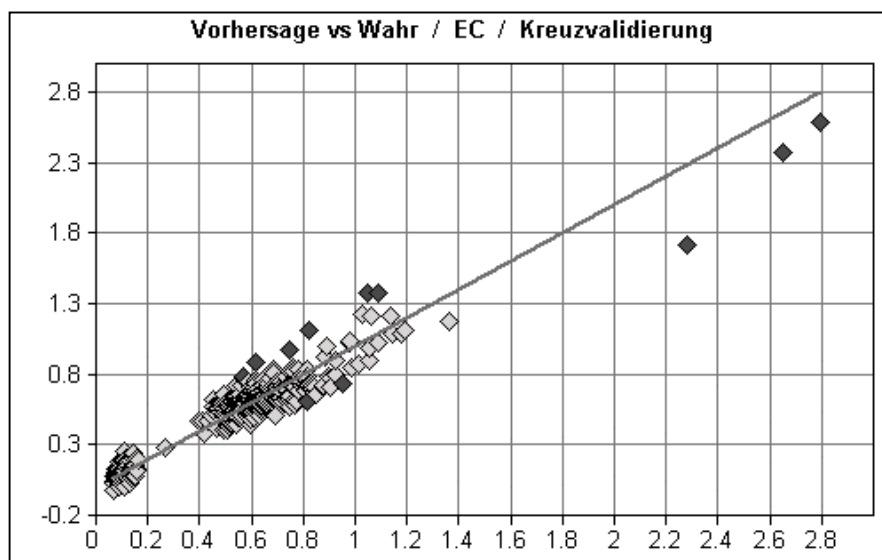
Durch die Lücke im Bereich von 0,2 % bis 0,4 % Epicatechin und den wenigen Proben über 1,2 % Epicatechin können später Proben, die in diese Konzentrationsbereiche fallen, nur unzuverlässig bestimmt werden. Beim Testset (Abb. 40) treten jedoch ähnliche Konzentrationsspannen auf, was darauf schließen lässt, dass auch zukünftig nur selten Grüntees mit Epicatechingehalten in diesen Bereichen auftreten werden. Die Proben des Testsets und der Kalibrierung enthalten schließlich die gesamte Varianz der Epicatechingehalte, die im Laufe von vier Jahren aufgetreten ist.

Bei Einsatz des Modells zur Quantifizierung unbekannter Proben muß jedoch darauf geachtet werden, dass in diesen Bereichen die NIR-Bestimmung unzuverlässig ist.

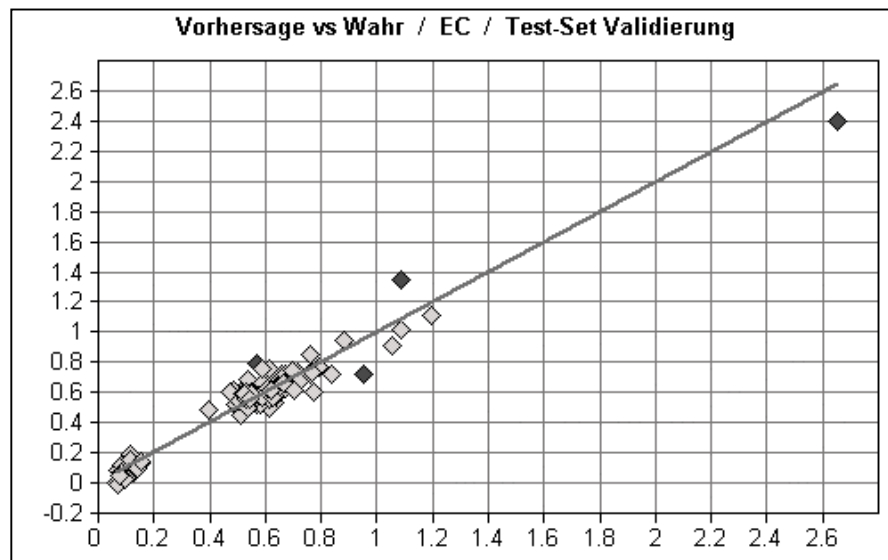
Tabelle 29: Statistische Parameter der Epicatechin-Kalibration

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% Epicatechin]	R^2 [%]	RMSEP [% Epicatechin]	MW [% Epicatechin]	RMSEP auf den MW bezogen
91,82	0,081	94,18	0,081	0,5757	14,07 %

Der Vorhersagefehler der Kalibration ist mit dem des Testsets identisch (Tab. 29). Der RMSEP von 14,07 % liegt auch hier deutlich über den geforderten 10%. Hinzu kommt, dass im niedrigen Bereich von weniger als 0,2 % Epicatechin (EC) der Vorhersagefehler, bei einem Mittelwert von 0,104 % EC, bei 80 % liegt. Dieses Maß an Richtigkeit entspricht auch bei der Bestimmung des Epicatechins nicht den Anforderungen, die an die Methode gestellt werden.



**Abbildung 39: Gesamtkalibration zur Bestimmung von Epicatechin;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epicatechin] (X-Achse) und der NIR-
Vorhersagen [% Epicatechin](Y-Achse)**



**Abbildung 40: Testset zur Bestimmung von Epicatechin in Grüntee;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epicatechin] (X-Achse) und der NIR-
Vorhersagen [% Epicatechin] (Y-Achse)**

Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Variationskoeffizienten der NIR-Einzelmessungen von 40 Grünteeproben mit den Referenzmessungen verglichen (Tab. 30).

Tabelle 30: Vergleich der Präzisionen der NIR-Bestimmung von Epicatechin mit der HPLC-Analytik

s [% EC]	MW [% EC]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0620	0,6600	9,45	4,88

Der Variationskoeffizient ist bei der NIR-Bestimmung fast doppelt so hoch wie bei der HPLC-Analytik. Die NIR-Methode weist somit eine deutliche Streuung bei den Einzelmessungen auf.

Die NIR - Kalibration zur Bestimmung des Epicatechingehaltes im Grüntee entspricht aufgrund des großen Fehlers von 14,07 % nicht der Anforderung und kann die HPLC-Methode nicht ersetzen.

3.6.3 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epicatechingallatgehaltes (ECG) in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche können Tabelle 22 entnommen werden. Der Mittelwert der Epicatechingallatkonzentrationen der Kalibration und des Testsets ist weitgehend gleich und auch der Konzentrationsbereich der Kalibrierung ist weiter gefasst als bei den Testsetproben (Tab. 31). Die Gehalte bewegen sich beim ECG vorwiegend im Prozentbereich.

Tabelle 31: Verteilung der ECG-Konzentrationen auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Epicatechingallat]	Mittelwert der Referenzwerte [% Epicatechingallat]
Kalibrierung	0,0925 – 7,6710	1,2053
Testset	0,0980 – 7,0990	1,1639

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit den verwendeten 8 PLS-Faktoren bei 93,19 % (Tab. 32). Auch hier liegt R^2 über 90 %. Bereits in der Grafik der Kalibrierung ist die engere Streuung der Werte, die hier im Vergleich zur Catechinbestimmung durch die höheren Analytkonzentrationen auftreten, auffallend (Abb. 41). Drei Proben mit Gehalten zwischen 5,5 % und 7,6 % ECG weisen deutlich geringere NIR-Werte als Referenzwerte auf. Doch auch hier wurden die drei Spektren in der Kalibrierung belassen, da weder eine Fehlmessung noch eine fehlerhafte Referenzanalytik bestätigt werden konnte. Ohne zwingenden Grund dürfen keine Proben aus dem Modell entfernt werden. Ähnliche Proben könnten sonst bei Einsatz der Methode nicht zuverlässig bestimmt werden. Schließlich bedeutet die unbegründete Entfernung von Spektren auch eine Verfälschung der tatsächlichen Leistung der Kalibrierung.

Tabelle 32: Statistische Parameter der ECG-Kalibration und des Testsets

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% ECG]	R^2 [%]	RMSEP [% ECG]	MW [% ECG]	RMSEP auf den MW bezogen
93,19	0,184	95,45	0,173	1,1639	14,86 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP bewegen sich in der gleichen Größenordnung (Tab. 32). Der RMSEP liegt mit 14,86 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) deutlich über den geforderten 10 %. In Bezug auf die Richtigkeit entspricht die Kalibrierung zur Bestimmung des Gehaltes an Epicatechingallat nicht den gestellten Anforderungen.

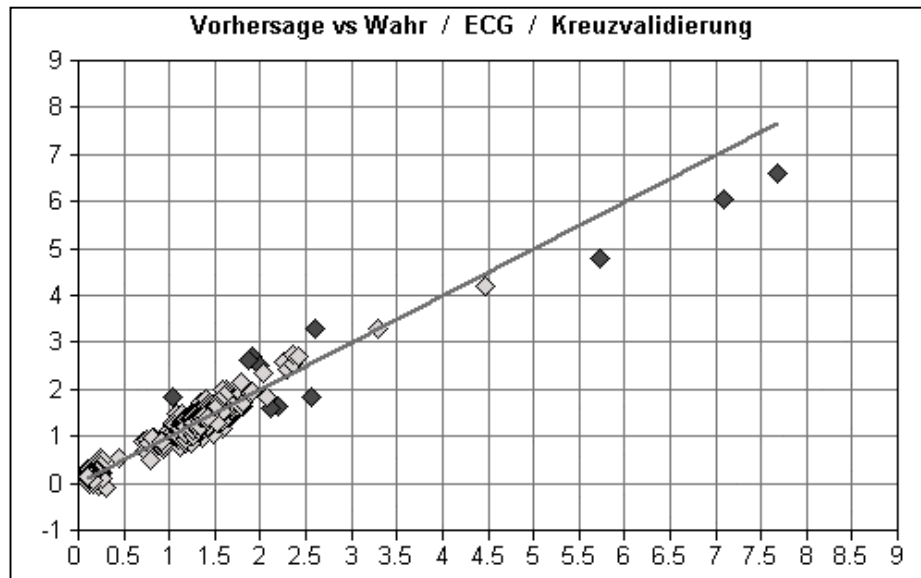


Abbildung 41: Gesamtkalibration zur Bestimmung von Epicatechingallat; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epicatechingallat] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Epicatechingallat] (Y-Achse)

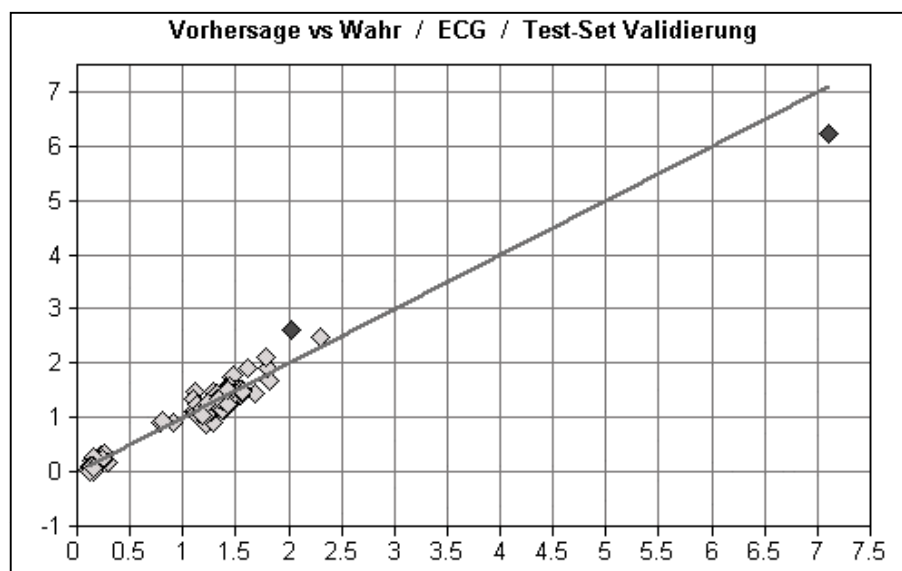


Abbildung 42: Testset zur Bestimmung von Epicatechingallat; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epicatechingallat] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Epicatechingallat] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden wiederum die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der Referenzdaten miteinander verglichen (Tab. 33).

Tabelle 33: Vergleich der Präzision der NIRS und der HPLC bei der Bestimmung von ECG im Testset

s [% ECG]	MW [% ECG]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,1280	1,4880	8,88	1,53

Der Variationskoeffizient der NIR-Bestimmung ist wesentlich höher als der Variationskoeffizient bei der HPLC-Analytik. Die Einzelmessungen der NIR-Methode streuen erheblich. Die Präzision ist zwar schlechter als die der Referenzanalytik, jedoch besser als die der NIR-Methoden zur Bestimmung des Catechin- und des Epicatechins.

Die Robustheit der Methode zeigt sich in der Zuverlässigkeit bei der Bestimmung des Testsets (Abb. 42). Die Werte streuen nicht stark, sondern liegen in einem engen Bereich. Die einzelne Probe mit dem hohen ECG-Gehalt von 7,1 % weicht in der Differenz der beiden Methoden stärker ab als die Proben mit den niedrigen Konzentrationen. Diese Probe wird bei der NIRS mit einem geringeren Analytgehalt angegeben als bei der HPLC. Die Ursache ist wohl darin zu sehen, dass bereits bei der Kalibrierung die höheren Konzentrationen geringere Konzentrationswerte als die HPLC aufweisen. Es ist möglich, dass diese Abweichung nicht an der geringen Zahl Proben mit höheren ECG-Gehalten liegt, sondern dass die Differenz zwischen den beiden Methoden abhängig von der Konzentration ist. Dies kann jedoch auch durch die geringe Anzahl Proben in den höheren Konzentrationsbereichen in der Kalibration bedingt sein.

Insgesamt wurden die Testsetproben zwar zuverlässig, ohne erkennbare Ausreißer, aber mit einem Fehler von mehr als 10 % bestimmt. Diese Ungenauigkeit lässt auch hier einen Einsatz der NIRS in der Routineanalytik zur Bestimmung des Gehaltes von ECG in Grüntee nicht zu.

3.6.4 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epigallocatechingehaltes (EGC) in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche können aus Tabelle 22 entnommen werden. Der Mittelwert der Epigallocatechinkonzentrationen der Kalibration und des Testsets sind weitestgehend gleich und auch der Konzentrationsbereich der Kalibrierung ist gegenüber dem Testset weiter gefasst (Tab. 34). Die Gehalte liegen hier vorwiegend im Prozentbereich.

Tabelle 34: Verteilung der EGC-Konzentrationen bei Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Epigallocatechin]	Mittelwert der Referenzwerte [% Epigallocatechin]
Kalibrierung	0,0960 – 4,1660	1,2053
Testset	0,0961 – 3,2720	1,1639

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit den verwendeten 11 PLS-Faktoren bei 91,77 % (Tab. 35). Auch hier liegt R^2 nur wenig über 90 %. Bereits bei der Grafik der Kalibrierung ist trotz der relativ hohen Analytkonzentrationen die Streuung der Werte auffallend (Abb. 43). Ausreißer konnten bei der Überprüfung der Spektral- und Referenzdaten nicht bestätigt werden. Die Streuung der Werte ist schließlich auch bei allen Kalibrierproben relativ hoch. Somit könnte eine Entfernung der Proben mit den geringsten Korrelationen zwischen den Spektral- und Referenzdaten sicher keine Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes oder Verringerung des Vorhersagefehlers ermöglichen.

Tabelle 35: Statistische Parameter der Kalibration zur EGC Bestimmung

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% EGC]	R^2 [%]	RMSEP [% EGC]	MW [%EGC]	RMSEP auf den MW bezogen
91,77	0,190	92,86	0,200	1,8151	11,02 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind fast identisch (Tab. 35). Der RMSEP liegt mit 11,02 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) nur wenig über dem Grenzwert des zulässigen Fehlers von 10 %.

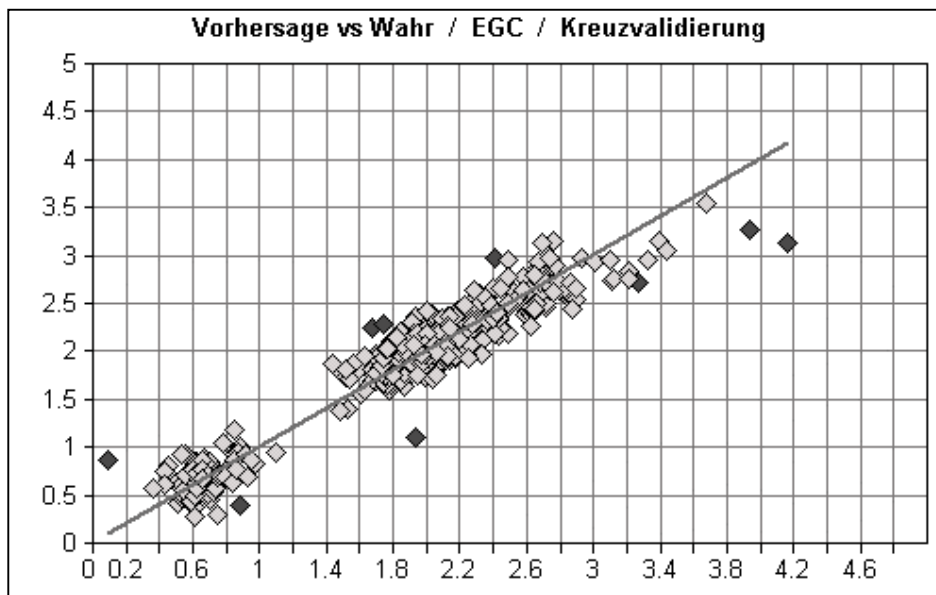


Abbildung 43: Gesamt-Kalibrierung zur Bestimmung von EGC in Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epigallocatechin] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Epigallocatechin] (Y-Achse)

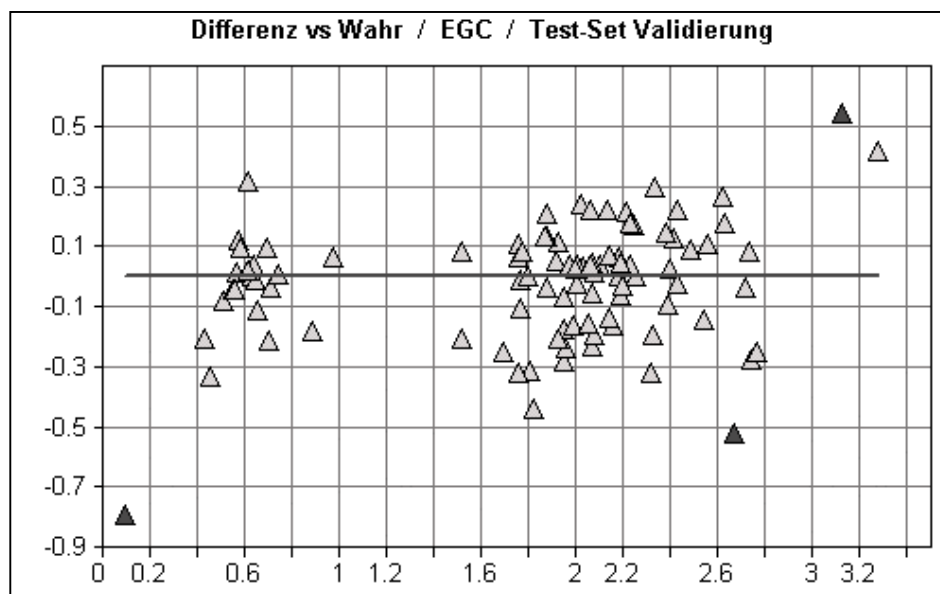


Abbildung 44: Testset zur Bestimmung von EGC in Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Epigallocatechin] (X-Achse) und der Differenzen der NIR-Vorhersagen zu den HPLC-Werten [% Epigallocatechin] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden wiederum die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der Referenzdaten miteinander verglichen (Tab. 36).

Tabelle 36: Vergleich der Präzision der EGC-Bestimmung der Testsetproben mittels NIRS und HPLC

s [% EGC]	MW [% EGC]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0960	2,27	4,32	4,53

Die Variationskoeffizienten der NIR-Bestimmung und der HPLC-Analytik sind fast identisch. Die Streuungen der Einzelmessungen sind dadurch bei beiden Methoden etwa gleich. Das bedeutet, dass die Methoden bezüglich der Präzision der Epigallocatechinbestimmung vergleichbar sind.

Die Robustheit der Methode zeigt sich in der Zuverlässigkeit bei der Bestimmung des Testsets (Abb. 44). Die Abweichungen zwischen den beiden Methoden bevorzugen keine der beiden Richtungen. Ebenso ist kein konzentrationsabhängiger Trend zu erkennen. Drei einzelne Proben mit den höchsten und dem geringsten EGC-Gehalt weichen in der Differenz der beiden Methoden stärker ab als die restlichen Proben. Da weder die Mahalanobis Distanz noch der FValue-Wert der Proben erhöht waren und auch die Referenzwerte bei der Wiederholung bestätigt wurden, sind diese Proben mit der größeren Abweichung nicht als Ausreißer zu werten. Da drei abweichende Proben bei einer Testsetgröße von insgesamt 97 Proben nicht maßgebend sind, kann die Kalibrierung als robust eingestuft werden.

3.6.5 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Epigallocatechingallatgehaltes (EGCG) in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche können Tabelle 22 entnommen werden. Der Mittelwert der Epigallocatechingallatkonzentrationen der Kalibrierung und des Testsets sind weitestgehend gleich und der Konzentrationsbereich der Kalibrierung größer als der des Testsets (Tab. 37). Die EGCG - Gehalte bewegen sich im Prozentbereich.

Tabelle 37: Verteilung der Konzentrationswerte von EGCG auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Epigallocatechingallat]	Mittelwert der Referenzwerte [% Epigallocatechingallat]
Kalibrierung	0,9361 – 8,0420	4,3004
Testset	0,9380 – 7,2830	4,1527

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit den verwendeten 10 PLS-Faktoren bei 95,46 % (Tab. 38). R^2 liegt somit deutlich über der geforderten 90 % Marke. Das bedeutet eine gute Korrelation zwischen Spektral- und Konzentrationsdaten. Die Grafik der Kalibrierung zeigt eine relativ enge Streuung der Werte entlang der Achse (Abb. 45). Einige Spektren sind von der Software

als Ausreißer gekennzeichnet. Bei der Überprüfung konnten diese nicht als Ausreißer bestätigt werden. Von der Software werden stets die Proben mit der größten Differenz zwischen dem NIR- und dem Referenzwert gekennzeichnet, unabhängig davon, ob viele andere Proben nur wenig geringere Differenzen aufweisen. Die Spektren wurden deshalb in der Kalibrierung belassen.

Tabelle 38: Statistische Parameter der Kalibration zur Bestimmung von EGCG

Kalibration		Testset			
R ² [%]	RMSECV [% EGCG]	R ² [%]	RMSEP [% EGCG]	MW [% EGCG]	RMSEP auf den MW bezogen
95,46	0,342	96,55	0,32	4,1527	7,71 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind ähnlich (Tab. 38). Der RMSEP liegt mit 7,71 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) deutlich unter dem Grenzwert von 10 %.

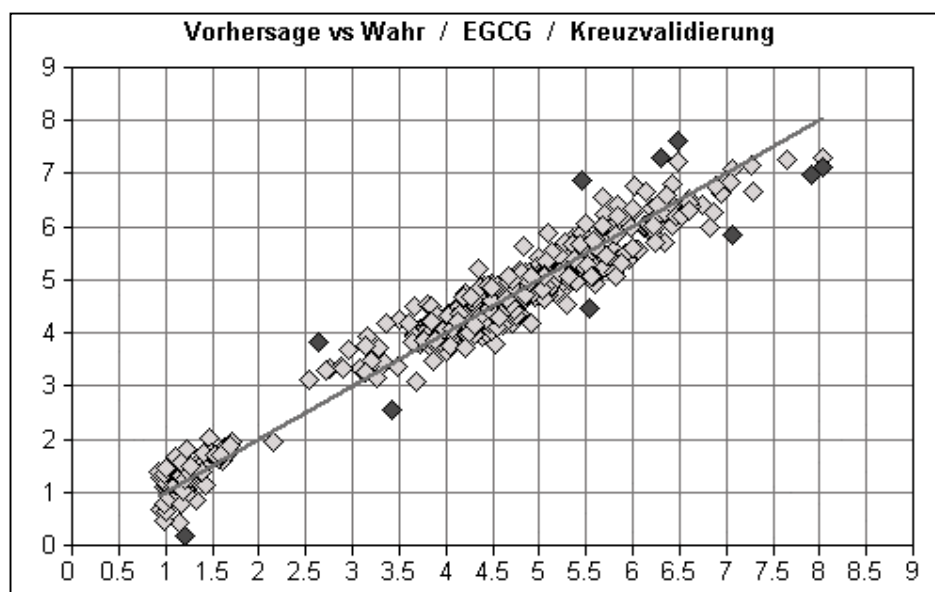


Abbildung 45: Gesamtkalibration zur Bestimmung von Epigallocatechingallat;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [% EGCG] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% EGCG] (Y-Achse)

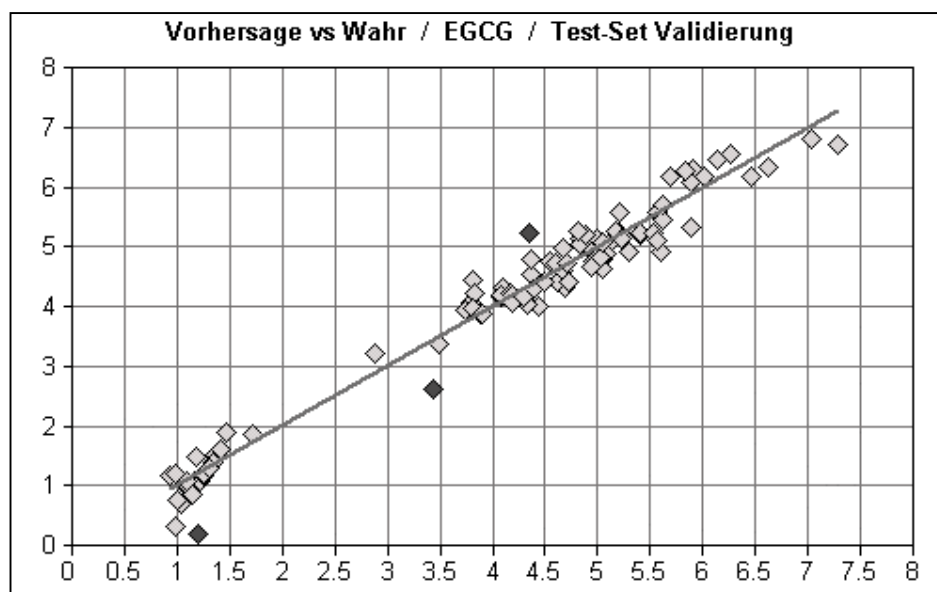


Abbildung 46: Testset zur Bestimmung von EGCG in Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% EGCG] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [%EGCG] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der HPLC-Daten miteinander verglichen (Tab. 39).

Tabelle 39: Vergleich der Präzision der NIRS- und der HPLC-Bestimmung von EGCG

s [%EGCG]	MW [% EGCG]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,1060	5,37	2,04	2,53

Die Variationskoeffizienten der NIR-Bestimmung und der HPLC-Analytik sind auch hier fast identisch. Die Streuung der Einzelmessungen ist bei der NIR-Kalibrierung sogar geringer als bei der HPLC-Methode. Das bedeutet, dass die Präzision im Falle der NIR - Quantifizierung des Epigallocatechingallates besser ist.

Die Robustheit der Methode zeigt sich in der Zuverlässigkeit bei der Quantifizierung der Testsetproben (Abb. 46). Die Proben sind entlang der Winkelhalbierenden gleichmäßig angeordnet und durch die NIR-Methode weder zu hoch, noch zu gering quantifiziert. Das Modell kann als robust angesehen werden und die Richtigkeit in diesen Konzentrationsbereichen zeigt, dass das NIRS bei den höheren Analytgehalten bzgl. der Richtigkeit und Richtigkeit durchaus Fehlergrenzen von 10 % unterschreiten kann.

3.6.6 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Theogallingehaltes in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche sind in Tabelle 22 zusammengestellt. Der Mittelwert der Theogallinkonzentrationen der Kalibration und des Testsets sind weitestgehend gleich und der Konzentrationsbereich der Kalibrierung größer als der des Testsets (Tab. 40).

Tabelle 40: Verteilung der Konzentrationswerte von Theogallin auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Theogallin]	Mittelwert der Referenzwerte [% Theogallin]
Kalibrierung	0,1199 – 3,5930	0,8198
Testset	0,2049 – 3,5750	0,8457

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit 92,02 % und 8 PLS-Faktoren über 90 % (Tab. 41). Das bedeutet eine gute Korrelation zwischen den Spektral- und den Konzentrationsdaten. Die Grafik der Kalibrierung zeigt eine enge Streuung der Werte entlang der Achse (Abb. 47). Es sind keine Ausreißer entfernt worden.

Tabelle 41: Statistische Parameter der Kalibration zur Bestimmung des Theogallingehaltes

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% Theogallin]	R^2 [%]	RMSEP [% Theogallin]	MW [% Theogallin]	RMSEP auf den MW bezogen
92,02	0,106	94,12	0,110	0,8457	13,01 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind fast identisch (Tab. 41). Der RMSEP liegt mit 13,01 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) über 10 % und bedingt dadurch eine große Ungenauigkeit bei der NIR-Vorhersage. Die Streuung der beiden Methoden ist im Testset (Abb. 48) größer als in der Kalibration (Abb. 47), aber doch noch relativ gering. Dennoch ist der Fehler bei der NIR-Bestimmung relativ hoch.

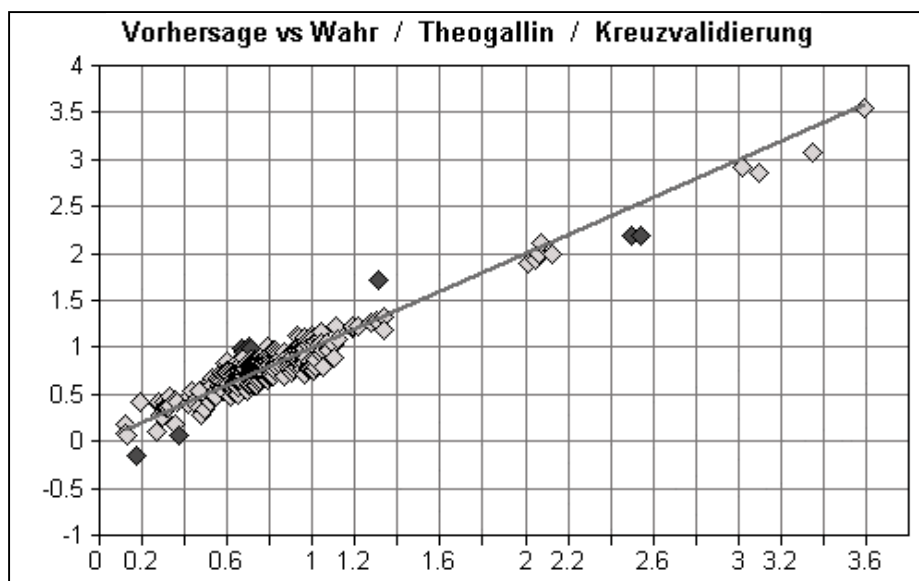


Abbildung 47: Gesamt-Kalibrierung zur Bestimmung des Theogallingehaltes; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Theogallin] (X-Achse) und NIR-Vorhersagen [% Theogallin] (Y-Achse)

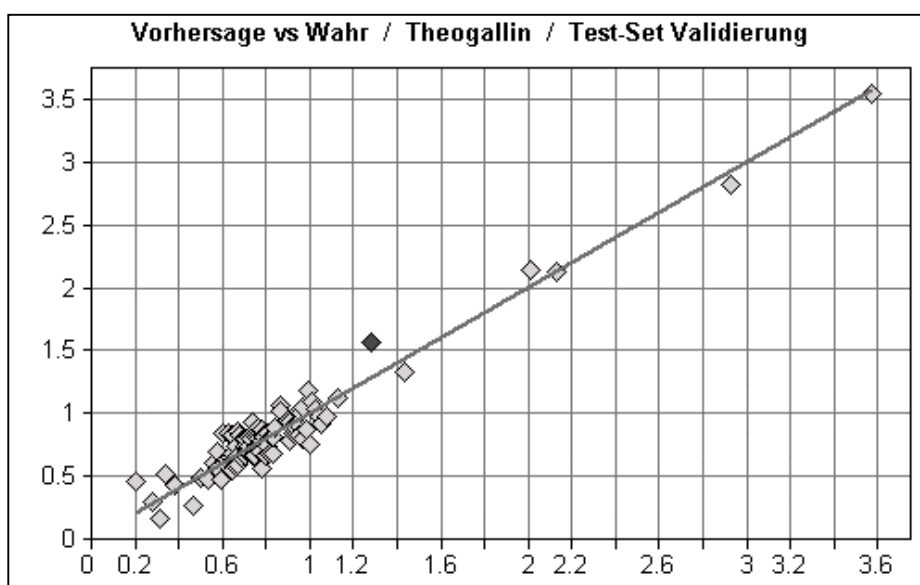


Abbildung 48: Testset zur Bestimmung des Theogallingehalt; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Theogallin] (X-Achse) und NIR-Vorhersagen [% Theogallin] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der HPLC-Daten miteinander verglichen (Tab. 42).

Tabelle 42: Vergleich der Präzision der Bestimmung von Theogallin mittels NIRS und HPLC

s (NIR) [% Theogallin]	MW (NIR) [% Theogallin]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0614	0,668	7,38	2,74

Die Variationskoeffizienten der NIR- und der HPLC-Analytik sind sehr unterschiedlich. Im Falle der HPLC – Methode ist die Streuung der Einzelmessungen deutlich geringer als bei der NIR-Analytik. Das bedeutet, dass die Präzision bei der Quantifizierung von Theogallin mit der HPLC-Methode wesentlich besser ist.

Die Robustheit der Methode ist sehr gut (Abb. 48). Die Proben des Testsets zeigen keine größeren Abweichungen zwischen den beiden Modellen. Bei allen Konzentrationen und den hier eingesetzten Variabilitäten der Matrix ist die Differenz offensichtlich gleich. Die Abweichungen von 13,01 % sind bei den relativ hohen Analytkonzentrationen mit einem Mittelwert von 0,85 % Theogallin für eine Quantifizierung mittels NIRS jedoch bedeutend zu hoch.

3.6.7 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Theobromingehaltes in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Der Mittelwert der Theobromingehalte der Kalibration und des Testsets ist weitgehend gleich und der Konzentrationsbereich der Kalibrierung größer als der des Testsets (Tab. 43). Die Analytgehalte bewegen sich beim Theobromin mit einem Mittelwert von 0,06 % in sehr geringen Bereichen.

Tabelle 43: Verteilung der Theobrominkonzentrationen auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Theobromin]	Mittelwert der Referenzwerte [% Theobromin]
Kalibrierung	0,0120 – 0,2301	0,0568
Testset	0,0124 – 0,2170	0,0575

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit den verwendeten 13 PLS-Faktoren bei 92,42 % (Tab. 44). R^2 liegt somit über den geforderten 90 %. Das bedeutet eine ausreichende Korrelation zwischen den Spektral- und den Konzentrationsdaten.

Einige Spektren werden von der Software als Ausreißer gekennzeichnet. Bei der Überprüfung konnten diese jedoch nicht als Ausreißer bestätigt werden. Die Proben wurden deshalb in der Kalibrierung belassen.

Tabelle 44: Statistische Parameter der Theobromin-Kalibration

Kalibration		Testset			
R ² [%]	RMSECV [% Theobromin]	R ² [%]	RMSEP [% Theobromin]	MW [% Theobromin]	RMSEP auf den MW bezogen
92,42	0,0092	93,16	0,0083	0,0575	14,44 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind ähnlich hoch (Tab. 44). Doch der RMSEP liegt mit 14,44 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) deutlich über dem zulässigen Fehler von 10 %.

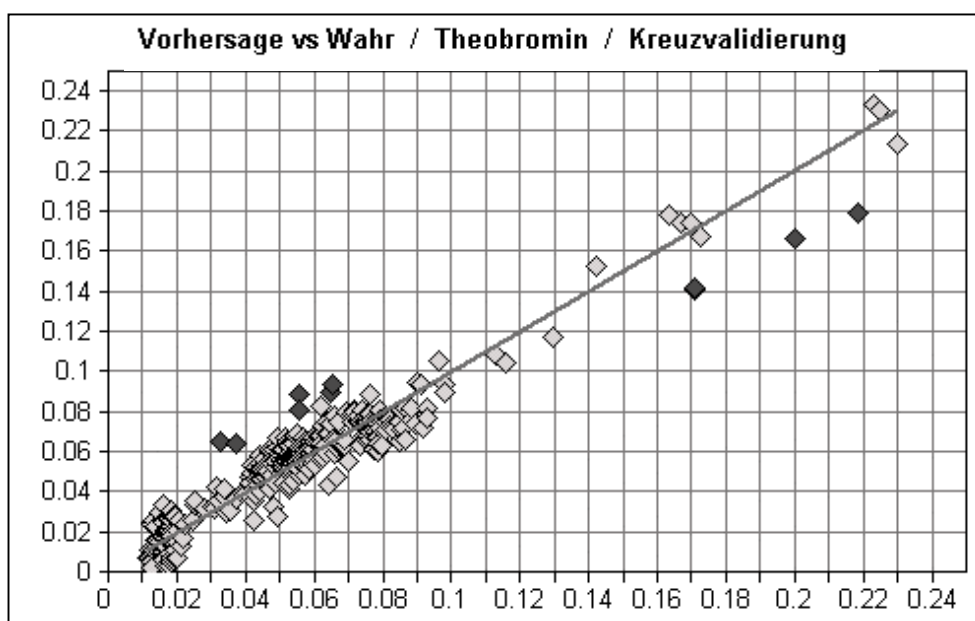


Abbildung 49: Gesamt-Kalibrierung zur Bestimmung von Theobromin; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Theobromin] (X-Achse) und NIR-Vorhersagen [% Theobromin] (Y-Achse)

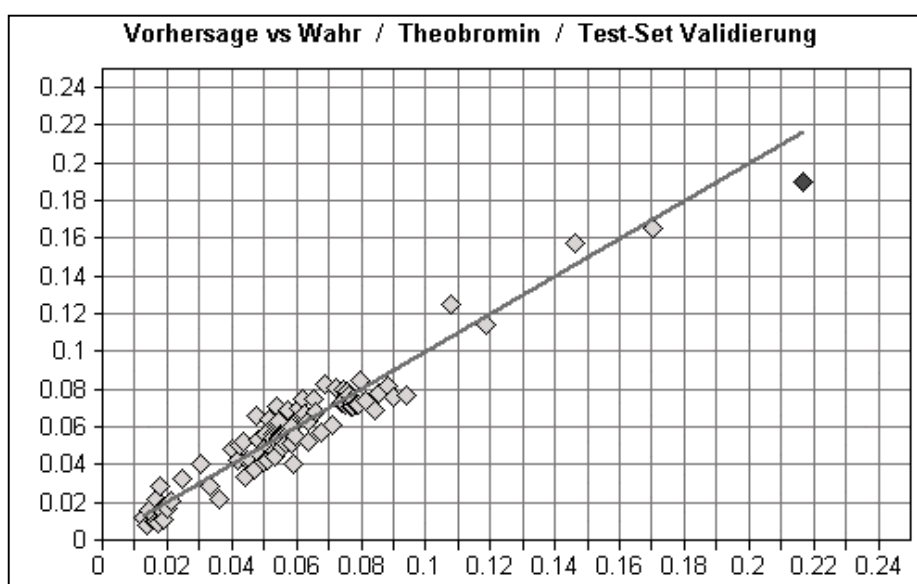


Abbildung 50: Testset zur Bestimmung von Theobromin; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Theobromin] (X-Achse) und NIR-Vorhersagen [% Theobromin] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen von 40 Grünteeproben der NIR- und der HPLC-Analytik miteinander verglichen (Tab. 45).

Tabelle 45: Vergleich der Präzision der Bestimmung von Theobromin in Grüntee mittels NIRS und HPLC

s [% Theobromin]	MW [% Theobromin]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0039	0,077	5,25	3,32

Der Variationskoeffizient der NIR-Bestimmung ist höher als der der HPLC-Analytik. Hier ist die Streuung der Einzelmessungen bei der HPLC-Methode geringer als bei der NIR-Analytik. Das bedeutet, dass die Quantifizierung des Theobromins mit der HPLC präziser ist.

Die Zuverlässigkeit der Methode ist sehr gut (Abb. 50). Die Proben des Testsets zeigen keine Ausreißer und die Differenzen zwischen den beiden Analysenmethoden sind bei allen Konzentrationen und hier eingesetzten Grünteesorten und Anbaugebieten offensichtlich gleich. Die Abweichung von 14,44 % ist zu hoch für eine genaue Quantifizierung. Bedingt durch die geringen Analytkonzentrationen war das aber, wie die Erfahrung mit der Restcoffeingehaltsbestimmung an entcoffeiniertem Schwarztee gezeigt hatte, zu erwarten.

3.6.8 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Gallussäuregehaltes in Grüntee

Die verwendete Datenvorbehandlung und Frequenzbereiche sind Tabelle 22 zu entnehmen. Die Mittelwerte der Analytkonzentrationen der Kalibration und des Testsets sind fast identisch und die Konzentrationsspanne der Kalibrierung ist etwas weiter gefasst als die des Testsets (Tab. 46). Der Analytgehalt bewegt sich hier (bei einem Mittelwert von 0,11 %) in einem sehr geringen Bereich.

Tabelle 46: Verteilung der Gallussäuren-Konzentration auf Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Gallussäure]	Mittelwert der Referenzwerte [% Gallussäure]
Kalibrierung	0,0124 – 0,1838	0,1103
Testset	0,0132 – 0,1841	0,1056

Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt, bei 9 PLS-Faktoren, mit 86,51 % weit unter 90 % (Tab. 47). Das bedeutet eine ungenügende Korrelation zwischen den Spektral- und den Konzentrationsdaten. Die Grafik der Kalibrierung zeigt eine große Streuung der Werte entlang der Achse (Abb. 51). Einige Spektren sind auch hier von der Software als Ausreißer gekennzeichnet worden. Wiederum wurden keine Proben entfernt.

Tabelle 47: Statistische Parameter der Gallussäuren-Gesamt-Kalibration von Grüntee

Kalibration		Testset			
R^2 [%]	RMSECV [% Gallussäure]	R^2 [%]	RMSEP [% Gallussäure]	MW [% Gallussäure]	RMSEP auf den MW bezogen
86,51	0,012	89,17	0,011	0,1056	10,42 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind fast identisch (Tab. 47). Der RMSEP liegt bei der Bestimmung der Gallussäure mit 10,42 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) nur gering über 10 %.

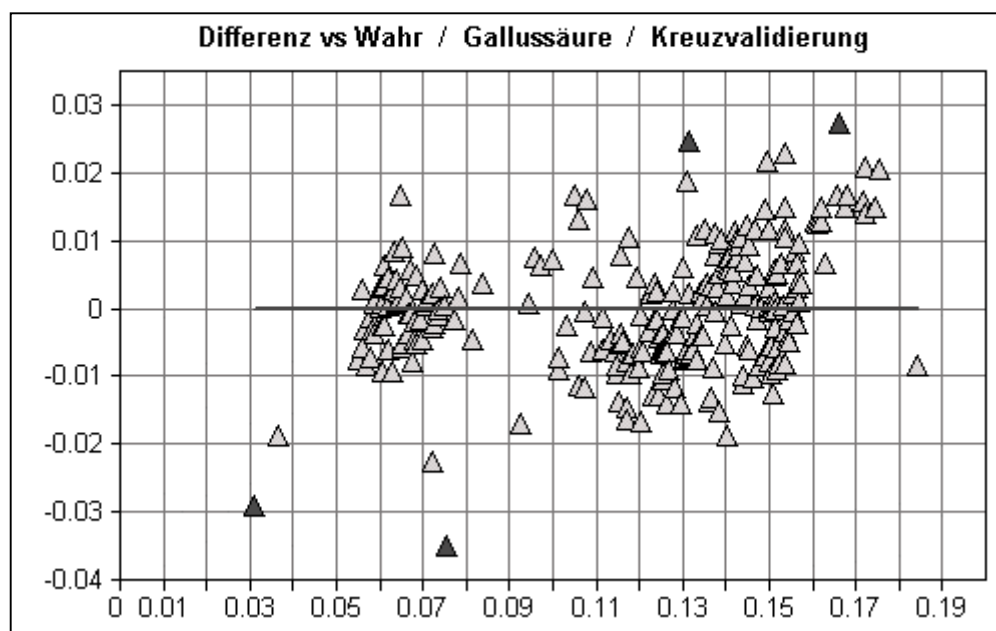


Abbildung 51: Gesamt-Kalibrierung zur Bestimmung von Gallussäure; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Gallussäure] (X-Achse) und der Differenzen (NIR-Vorhersagen-HPLC-Werte) [% Gallussäure] (Y-Achse)

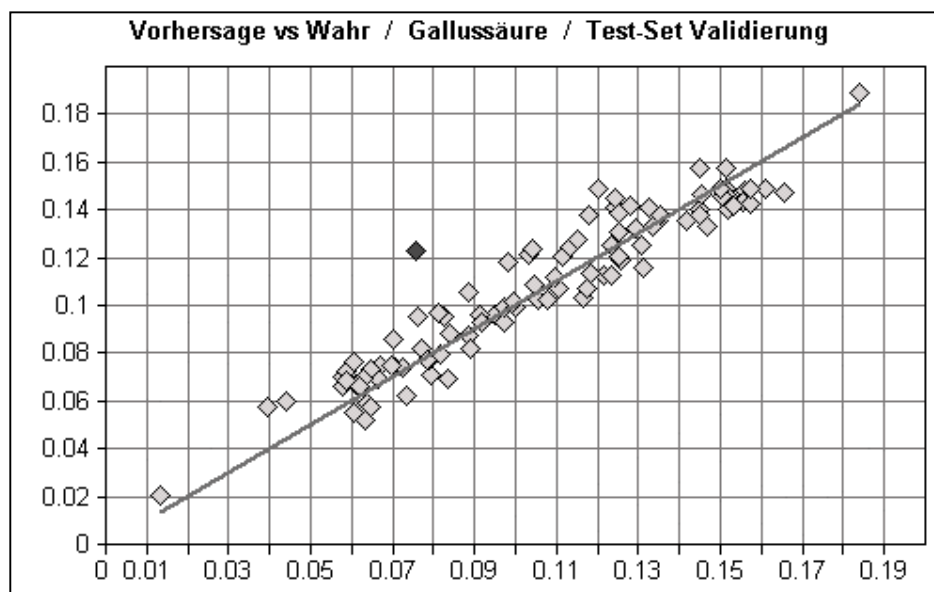


Abbildung 52: Testset zur Bestimmung des Gallussäuregehaltes in Grüntee;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Gallussäure] (X-Achse) und der NIR-
Vorhersagen [% Gallussäure] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der HPLC-Daten miteinander verglichen (Tab. 48).

Tabelle 48: Vergleich der Präzision der Gallussäurebestimmung mittels NIRS und HPLC

s [% Gallussäure]	MW [% Gallussäure]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0040	0,11	3,83	3,33

Die Variationskoeffizienten der NIR- und der HPLC-Analytik sind fast identisch. Die Streuung der Einzelmessungen bei der HPLC-Methode ist hier etwas geringer als bei der NIR-Analytik. Das bedeutet, dass die Präzision bei der Quantifizierung der Gallussäure mittels HPLC etwas besser ist. Es wird aber auch deutlich, dass die Bestimmung der Gallussäure mit einem VK von 3,83 % mit dem NIRS sehr präzise möglich ist.

Die NIR-Kalibrierung bestimmt die Gallussäure offensichtlich bei allen Proben mit der gleichen Differenz zwischen den beiden Methoden (Abb. 52). Bei allen Konzentrationen und hier eingesetzten Variabilitäten der Matrix ist die Abweichung offensichtlich gleich. Der Vorhersagefehler von 10,42 % ist bei diesen geringen Analytkonzentrationen mit einem Mittelwert von 0,11 % Gallussäure akzeptabel für eine Quantifizierung mittels NIRS.

3.6.9 NIR-Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in Grüntee

Die eingesetzte Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche entsprechen den Parametern, die bei der „Entcoff“-Methode zur Coffeinbestimmung im entcoffeynierten Schwarztee verwendet wurden (vgl. Kap. 3.2, Tab. 7). Die Mittelwerte der Coffeingehalte der Kalibration und des Testsets sind weitestgehend gleich und auch der Konzentrationsbereich der Kalibrierung ist gegenüber dem Testset weiter gefasst (Tab. 49).

Die Kalibrierung enthält entcoffeynierten und nicht entcoffeynierten Grüntee. Da der Grüntee mittels CO₂ – Extraktion entcoffeyniert wird, und bei dieser Entcoffeynierungsart selektiv Coffein aus dem Tee entfernt wird, wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Matrixveränderung bei der Entcoffeynierung nicht so deutlich ist wie beim Schwarztee. Dadurch ist die Konzentrationsspanne entsprechend vergrößert. Zu prüfen ist nun, ob eine gemeinsame Coffeinkalibration den Anforderungen bzgl. der Richtigkeit und der Robustheit gerecht wird.

Tabelle 49: Verteilung der Coffeinkonzentrationen bei Kalibration und Testset

	Konzentrationsspanne [% Coffein]	Mittelwert der Referenzwerte [% Coffein]
Kalibrierung	0,0309 – 4,2110	0,8223
Testset	0,0312 – 4,2090	0,8042

Das Bestimmtheitsmaß R² liegt bei 9 PLS-Faktoren mit 99,03 % sehr hoch (Tab. 50). Bereits bei der Grafik der Kalibrierung ist die enge Streuung der Werte bei höheren Konzentrationswerten auffallend (Abb. 53).

Zwischen den entcoffeynierten Grünteeproben und den Proben mit vollem Coffeingehalt besteht sowohl bei der Kalibrierung als auch beim Testset eine große Lücke zwischen 0,3 % und 1,0 % Coffein. Es existieren in diesem Zwischenraum nur zwei Proben mit etwa 0,7 % Coffeingehalt. Die Bestimmung von Mustern mit einem Coffeingehalt in dieser Konzentrationsspanne kann mit dieser Methode nicht zuverlässig sein. Da in der Routineanalytik im Untersuchungszeitraum von vier Jahren keine Grüntees mit Coffeingehalten in diesem Bereich anfielen, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass zu einem späteren Zeitpunkt entsprechende Proben anfallen.

Tabelle 50: Statistische Parameter der Coffein-Kalibration

Kalibration		Testset			
R ² [%]	RMSECV [% Coffein]	R ² [%]	RMSEP [% Coffein]	MW [% Coffein]	RMSEP auf den MW bezogen
99,03	0,105	99,10	0,102	0,8042	12,68 %

Die Vorhersagefehler RMSECV und RMSEP sind identisch und damit ist eine wichtige Voraussetzung für eine funktionierende Kalibrierung erfüllt (Tab. 50). Der RMSEP liegt mit 12,68 % (bezogen auf den Mittelwert des Testsets) zunächst über dem Grenzwert des zulässigen Fehlers von 10 %. Dieser Vorhersagefehler muß bei einer Kalibrierung, die zwei so unterschiedliche Konzentrationsbereiche aufweist, differenziert betrachtet werden. Der RMSEP ist mit 0,102 % Coffein für die nicht entcaffeinieren Grünteeproben durchaus akzeptabel. Der Mittelwert dieser Proben liegt bei 2,31 % Coffein und damit beträgt der Fehler bei der Bestimmung nur noch 4,42 %. Damit liegt der Fehler sogar unter 5 % und dies ist für eine Schnellmethode wie die NIR-Messung ein gutes Ergebnis. Für die entcaffeinieren Proben liegt der Fehler, bei einem Mittelwert der Proben von 0,13 % Coffein, bei 78,46 %. Dies macht eine quantitative Bestimmung unmöglich.

Die Grünteemuster werden meist auf Gehalte < 0,2 % Coffein extrahiert. Durch eine gemeinsame Kalibrierung mit den nicht entcaffeinieren Proben erhöht sich der Vorhersagefehler entsprechend und die niedrigen Konzentrationen werden wenig genau vorhergesagt. Beim entcaffeinieren Schwarztee wurde bereits gezeigt, dass die Trennung der entcaffeinieren Proben von den unbehandelten Tees den Vorhersagefehler senkt (vgl. Kapitel 3.2).

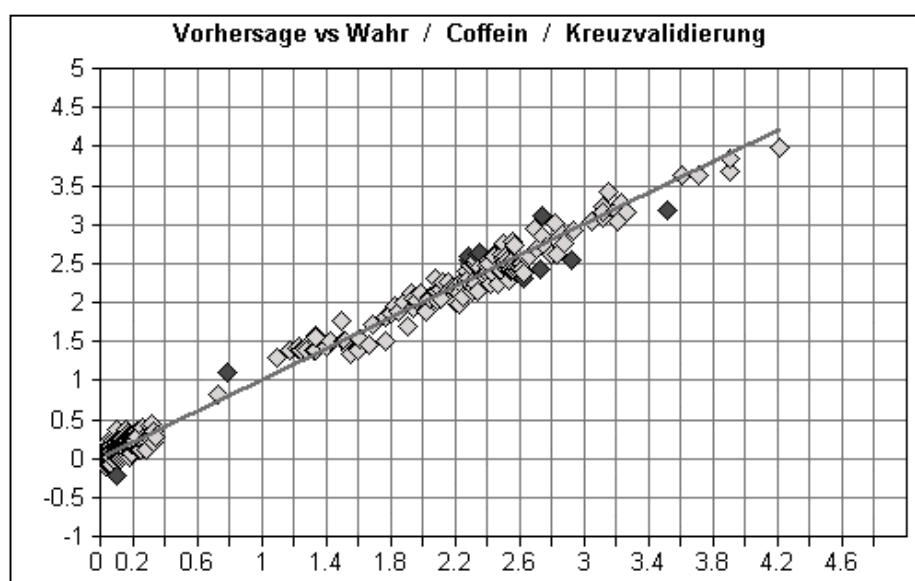


Abbildung 53: Gesamtkalibration zur Bestimmung von Coffein; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

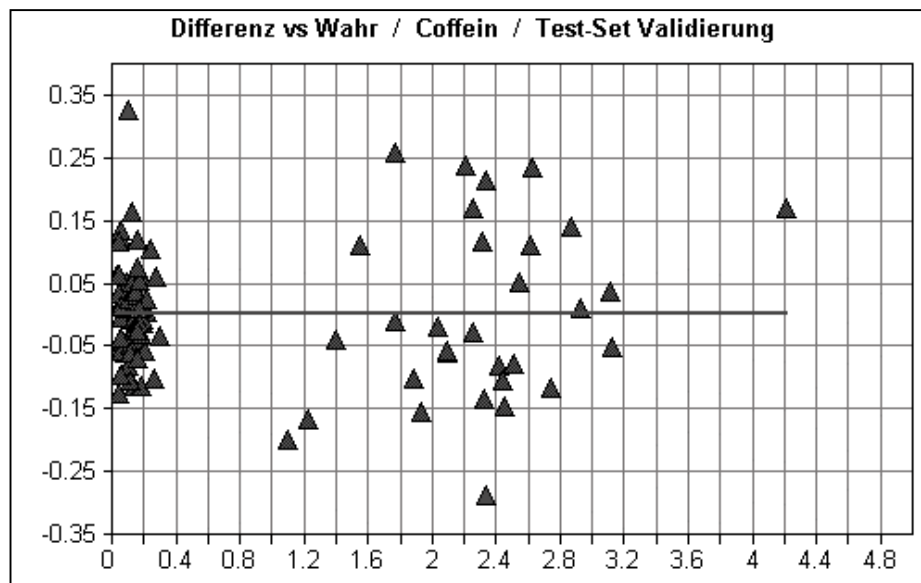


Abbildung 54: Testset zur Bestimmung des Coffeingehaltes in Grüntee;
Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse) und der Differenzen
(NIR-Vorhersagen-HPLC-Werte) [% Coffein] (Y-Achse)

Bei der Ermittlung der Präzision wurden wiederum die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen der NIR- und der Referenzdaten miteinander verglichen (Tab. 51).

Tabelle 51: Vergleich der Präzision der Bestimmung von Coffein mittels NIRS und HPLC

s [% Coffein]	MW [% Coffein]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0698	0,7546	9,25	2,75

Der Variationskoeffizient der HPLC-Analytik ist wesentlich geringer als der VK der NIR-Messungen. Das bedeutet, dass die Präzision bei der Quantifizierung des Coffeins mit der HPLC deutlich größer ist.

Die Robustheit der Methode zeigt sich in der Zuverlässigkeit bei der Quantifizierung des Testsets (Abb. 54). Die Abweichungen zwischen den beiden Methoden bevorzugen keine der beiden Richtungen. Die Proben des Testsets werden demnach zuverlässig ohne erkennbaren Trend bestimmt. Die Differenzen der NIR- zu den HPLC-Werten sind jedoch bei den entcaffeinerten Tees etwa so groß wie die der „normalen“ Grüntees. Abweichungen der beiden Methoden von bis zu 0,15 % Coffein sind bei einem Mittelwert von 0,13 % Coffein nicht akzeptabel. Es scheint daher sinnvoller zu sein, den Coffeingehalt im Grüntee durch zwei getrennte Methoden zu bestimmen.

3.6.10 Zusammenfassung der Gesamtkalibrierungen Grüntee

Der Vorhersagefehler RMSECV der Kreuzvalidierung stimmt mit dem RMSEP des Testsets bei allen Substanzen sehr gut überein (Tab. 52). Dieses Kriterium muß bei einer guten Kalibrierung und einem zur Beurteilung dieser Methode geeigneten Testset erfüllt sein. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Kreuzvalidierung liegt, außer bei der Methode zur Bestimmung des Gallussäuregehaltes, über den geforderten 90 %.

Tabelle 52: Vorhersagefehler der NIR-Methoden bei den untersuchten Inhaltsstoffen von Grüntee

Substanz	RMSECV [% Analyt]	RMSEP [% Analyt]	MW des Testsets [% Analyt]	RMSEP auf den MW bezogen [%]
Theogallin	0,1060	0,1100	0,8457	13,01
Gallussäure	0,0120	0,0110	0,1056	10,42
Theobromin	0,0092	0,0083	0,0575	14,44
Epigallocatechin	0,1900	0,2000	1,8151	11,02
Epicatechingallat	0,1840	0,1730	1,1639	14,86
Epigallocatechingallat	0,3420	0,3200	4,1527	7,71
Epicatechin	0,0810	0,0810	0,5757	14,07
Catechin	0,0250	0,0290	0,1342	21,61
Coffein	0,1050	0,1020	0,8042	12,68

Aus Tabelle 52 geht hervor, dass bei fast allen Substanzen die NIR-Vorhersage mit einem höheren Fehler als 10 % behaftet ist. Nur die Bestimmung des Epigallocatechingallats weist einen geringeren Vorhersagefehler auf. Der Mittelwert der Konzentrationen ist bei diesem Teeinhaltsstoff auch am höchsten. Bei den entcoffinierten Schwarzteemustern wurde bereits deutlich, dass Gehaltsbestimmungen unter 0,1 % mittels NIRS nicht mit der geforderten Richtigkeit möglich sind. Bei der Bestimmung von Theobromin, Catechin und Gallussäure in Grüntee sind Konzentrationen in noch geringeren Bereichen zu finden. Bei allen anderen Kalibrationen, mit Ausnahme der EGCG-Kalibration, ist der Fehler nicht geringer. Die Ursache dafür kann in den niedrigen Konzentrationswerten begründet sein, die die Mehrzahl der Kalibrationsproben bei fast allen Substanzen aufweisen. Eine Schnellmethode wie die NIRS kann in diesen Konzentrationsbereichen offensichtlich die Gehalte der Inhaltsstoffe von Grüntee nicht mit einer zufriedenstellenden Richtigkeit bestimmen.

Bei den entcoffeynierten Schwarztees wurde aber auch deutlich, dass die Probenauswahl einen großen Einfluss auf den Vorhersagefehler einer Methode haben kann. Bei den hier vorgestellten Kalibrierungen wurden entcoffeynierte Grüntees mit nicht entcoffeynierten in einer Kalibrierung zusammengefasst, unter der Annahme, dass die Matrix des Tees durch die CO₂-Entcoffeynierung nicht gravierend verändert wird, wie dies bei der Ethylacetat-Entcoffeynierung der Fall ist. Einen Hinweis darauf, dass Unterschiede der Matrices bei nicht entcoffeynierten Tees und der mit CO₂ entcoffeynierten Tees bestehen könnten, gibt Literatur [65]. Dort wird beschrieben, dass bei der Lagerung von Erdbeeren Konzentrationsunterschiede bei Anthocyanen und anderen polyphenolischen Verbindungen auftraten, je nachdem, ob sie unter Luft-Atmosphäre oder CO₂-angereicherter Atmosphäre gelagert wurden. Bei der CO₂-Entcoffeynierung von Grünem Tee könnte sich demnach die Zusammensetzung der Teeinhaltsstoffe und dadurch die Matrix des Tees auf ähnliche Weise verändert haben.

Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, dass sich die Ergebnisse bezüglich der Richtigkeit und der Präzision der NIRS-Bestimmung wesentlich verbessert haben, nachdem für die entcoffeynierten Grüntees und die nicht entcoffeynierten Grüntees unterschiedliche Methoden entwickelt wurden. Diese wurden jeweils mit unabhängigen Testsets, die ebenso nur aus den entsprechenden Grüntees bestanden, getestet. Die Methoden sollen in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden.

3.6.11 Die Kalibrationen zur Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in entcaffiniertem Grüntee

Zunächst sollen die Ergebnisse der Kalibrierungen der entcaffinierten Grüntees vorgestellt werden (vgl. Kap. 4.4.10). 331 Grüntees der insgesamt 480 Proben stammen von entcaffinierten Mustern. 265 Proben wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktion verwendet, die restlichen 66 Proben bildeten das Testset. Wiederum wurde darauf geachtet, dass die Verteilung der Proben bezüglich der verschiedenen Anbauggebiete und Teesorten, sowie der jeweiligen Analytgehalte auf die Kalibrierung und das Testset homogen ist. Die Mittelwerte der Analytgehalte sind bei beiden Probensätzen fast identisch (Tab. 53) und auch die Gehaltsspanne der Kalibration ist weiter als die des Testsets.

Tabelle 53: Verteilung der Referenzwerte der untersuchten Substanzen auf das Testset und den Kalibriersatz bei entcaffiniertem Grüntee

Substanz	Konzentrationsspanne Kalibrierung [% Analyt]	Mittelwert der Referenzwerte der Kalibrierung [% Analyt]	Konzentrations- spanne Testset [% Analyt]	Mittelwert der Referenzwerte des Testsets [% Analyt]
Theogallin	0,1261 – 1,2740	0,8000	0,5669 – 1,1050	0,8019
Gallussäure	0,0312 – 0,1841	0,1186	0,0561 – 0,1749	0,1189
Theobromin	0,0113 – 0,2187	0,0498	0,0124 – 0,0980	0,0502
Epigallocatechin	0,0961 – 2,6201	1,6423	0,4931 – 2,3420	1,6486
Epicatechingallat	0,0925 – 2,0220	1,0015	0,1025 – 1,5810	1,0201
Epigallocatechin- gallat	0,9361 – 5,8150	3,7053	0,9902 – 5,5960	3,7265
Epicatechin	0,0670 – 1,0540	0,4607	0,0708 – 0,7352	0,4619
Catechin	0,0458 – 0,4045	0,1389	0,0495 – 0,2733	0,1388
Coffein	0,0310 – 0,7821	0,1350	0,0378 – 0,7310	0,1398

Die Parameter der Datenvorbehandlung und Frequenzbereiche können Tabelle 22 entnommen werden, da die optimalen Einstellungen hier die gleichen sind wie bei den Gesamtkalibrierungen. Die geeignete Anzahl Ranks wurde über den geringsten RMSECV bei der Kreuzvalidierung ermittelt (Tab. 54).

Die Vorhersagefehler RMSECV der Kreuzvalidierungen stimmen bei allen untersuchten Teeinhaltsstoffen gut mit dem RMSEP der Testsets überein (Tab. 54). Das Bestimmtheitsmaß

R^2 ist bei allen Substanzen, außer bei Theogallin und Coffein, deutlich höher als bei den gesamten Kalibrierungen (Tab. 22) und liegt für die Bestimmung der Gallussäure nun auch über 90 %. Nur bei der Coffeinemethode ist das Bestimmtheitsmaß wesentlich geringer als bei der Gesamtkalibrierung mit den nicht entcoffeynierten Grünteestees.

Tabelle 54: Die statistischen Parameter der Kalibrationen zur Bestimmung der Teeinhaltsstoffe in entcoffeyniertem Grüntee im Überblick

Substanz	Anzahl Ranks	R^2 [%] der Kalibration	RMSECV [% Analyt]	R^2 [%] des Testsets	RMSEP [% Analyt]	MW des Testsets [% Analyt]	RMSEP auf den MW bezogen [%]
Theogallin	11	90,69	0,058	86,00	0,052	0,8019	6,49
Gallussäure	7	93,66	0,009	93,45	0,009	0,1189	7,57
Theobromin	11	96,46	0,004	95,40	0,004	0,0502	7,97
Epigallocatechin	8	96,32	0,121	95,89	0,116	1,6486	7,04
Epicatechingallat	7	98,26	0,066	98,81	0,054	1,0201	5,29
Epigallocatechin-gallat	8	96,81	0,310	96,24	0,291	3,7265	7,81
Epicatechin	9	97,63	0,043	96,32	0,039	0,4619	8,44
Catechin	9	92,41	0,015	92,73	0,014	0,1388	10,09
Coffein	13	88,98	0,025	92,03	0,026	0,1398	18,60

Wird der RMSEP betrachtet (Tab. 53 und 54), wird deutlich, dass sich der Fehler beträchtlich verringert hat. Wenn die Coffeinbestimmung außer acht gelassen wird, zeigt sich, dass der Vorhersagefehler RMSEP des Testsets, bezüglich der Mittelwerte der Analytkonzentrationen, bei fast allen Methoden unter den geforderten 10 % liegt. Bei der Bestimmung des Catechins betrug dieser Fehler bei der Gesamtkalibrierung 21,61 % und ist nun bei der Methode der entcoffeynierten Grünteestees auf 10,09 % gesunken. Dieser, nur gering über der geforderten Grenze liegende Wert, kann noch akzeptiert werden.

Auch die Präzision der NIR-Bestimmungen verbesserte sich bei den entcoffeynierten Grünteeeproben. Da die Standardabweichung der Messungen erst errechnet werden kann, wenn die Spektren mittels einer Methode quantifiziert wurden, spielt der Vorhersagefehler auch dabei eine große Rolle. Folglich ist die Präzision bei fünf der neun Substanzen im Vergleich zu den Gesamtkalibrationen gestiegen, der Variationskoeffizient der Sechsfachmessungen von 40 entcoffeynierten Grünteestees hingegen entsprechend gesunken

(Tab. 55). Bei Theobromin, EGCG und Epicatechin hat sich die Präzision gegenüber der Gesamtkalibration etwas verschlechtert. Die Werte sind jedoch noch akzeptabel. Nicht akzeptiert werden kann der sehr hohe VK der NIR-Coffeinbestimmung von 16,02 %. Auf die Coffeinbestimmung wird ab Seite 111 näher eingegangen.

Tabelle 55: Vergleich der Präzisionen der NIRS-Kalibrationen aus entcaffeinierterm Grüntee (GT) , der NIR-Gesamtkalibration einschließlich nicht entcaffeinierter Grüntees und der HPLC

Substanz	s [% Analyt] Entcaff. GT	MW [% Analyt] Entcaff. GT	VK (NIR) [%] Entcaff. GT	VK (HPLC) [%]	VK (NIR) [%] Gesamt- kalibration
Theogallin	0,0226	0,7400	3,05	1,11	7,38
Gallussäure	0,0023	0,1112	2,11	3,33	3,83
Theobromin	0,0026	0,0385	6,64	3,32	5,25
Epigallocatechin	0,0338	1,4008	2,41	2,99	4,32
Epicatechingallat	0,0323	0,7934	4,07	3,19	8,88
Epigallocatechin-gallat	0,1473	3,1227	4,72	2,23	2,04
Epicatechin	0,0405	0,3809	10,64	1,05	9,45
Catechin	0,0086	0,1016	8,44	6,34	14,12
Coffein	0,0186	0,1164	16,02	12,2	9,25

Die Ergebnisse der Kalibrierungen des entcaffeinierter Grüntees entsprechen soweit den gestellten Anforderungen. Beim Vergleich der Quantifizierungen der Testsetproben wird zudem deutlich, dass alle enthaltenen Muster zuverlässig bestimmt werden konnten. Exemplarisch sind hier die Grafiken der Theogallin- und Catechin-Testsets aufgeführt (Abb. 55 und 56). Die Differenzen zwischen den Referenzwerten und den entsprechenden NIR-Vorhersagen ließen bei keinem untersuchten Teeinhaltsstoff markante Ausreißer erkennen. Die Abweichungen bewegten sich, schon aufgrund der gesunkenen Vorhersagefehler, in geringeren Bereichen als bei den Gesamtkalibrierungen. Dies ist beim Testset zur Bestimmung des Catechingehaltes deutlich feststellbar (Abb. 55). Bewegten sich die Differenzen der beiden Methoden bei der Gesamtkalibration in Bereichen bis zu $\pm 0,09$ % Catechin, treten nun Abweichungen bis maximal 0,038 % Catechin auf. Ein konzentrationsabhängiger Trend oder eine Bevorzugung einer bestimmten Richtung bei den Abweichungen konnte bei keinem Testset festgestellt werden.

Da die Testsets alle Herkunftsgebiete und Grünteesorten aus dem Analysenvorkommen von vier Jahren enthalten, sollten auch zukünftig alle Proben mit dem gleichen Fehler von weniger als 10 % (mit dem die Testsetproben bestimmt wurden) quantifizierbar sein. Die vorgestellten Methoden sind somit als robust einzustufen.

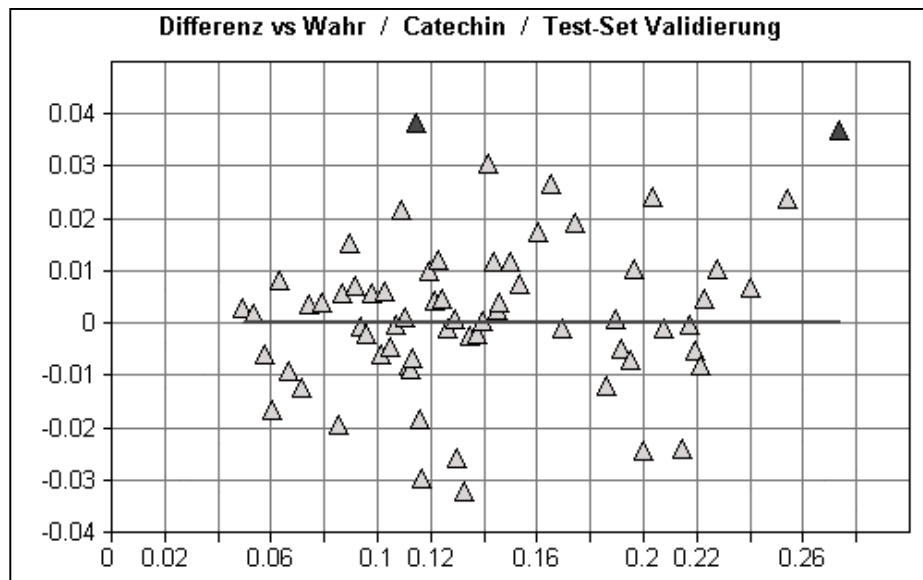


Abbildung 55: Testset zur Catechinbestimmung in entcoffiniertem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Catechin] (X-Achse) und der Differenzen der NIR-Vorhersagen zu den HPLC-Werten [% Catechin] (Y-Achse)

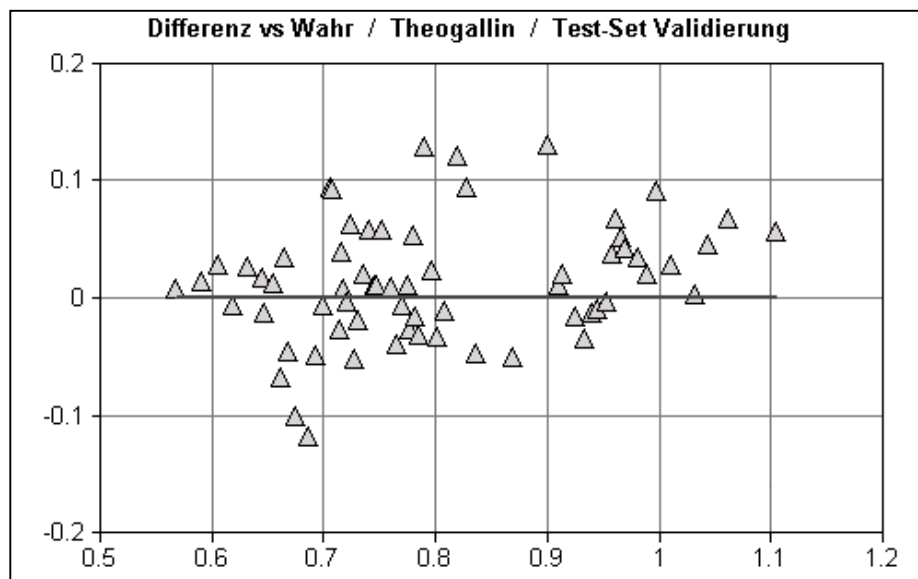


Abbildung 56: Testset zur Bestimmung des Theogallingehaltes in entcoffiniertem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Theogallin] (X-Achse) und der Differenzen der NIR-Vorhersagen zu den HPLC-Werten [% Theogallin] (Y-Achse)

Beim Coffein ist der RMSEP (bzgl. des Mittelwertes des Testsets) bei der Methode der entcoffinierten Grüntees im Gegensatz zur Gesamtmethode von 12,68 % auf 18,60 % gestiegen. Die Konzentrationsdaten bewegen sich nun natürlich in einem sehr viel geringeren

Bereich. Bei Theobromin, Catechin und Gallussäure sind die Konzentrationen jedoch noch geringer und die Vorhersagen sind trotzdem wesentlich besser als im Falle der Coffeinbestimmung. Bei der Betrachtung der Testsetproben kann ebenso wie bei der Kalibrierung (Abb. 57 und 58) keine extreme Streuung der Werte erkannt werden, die den im Vergleich zu Gallussäure, Theobromin und Catechin hohen Vorhersagefehler begründet. Das geringe Bestimmtheitsmaß von weniger als 90 % deutet aber bereits darauf hin, dass ein relativ großer Teil der Varianz der Daten durch das Modell nicht erklärt werden kann. Das spiegelt sich ebenso in der schlechten Präzision mit einem VK von 16,02 % wieder (Tab. 55).

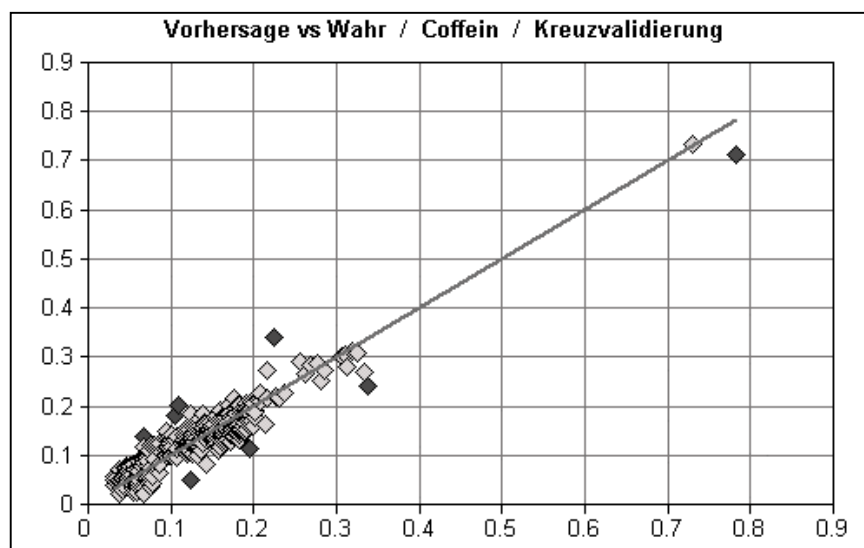


Abbildung 57 : Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in entcaffiniertem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

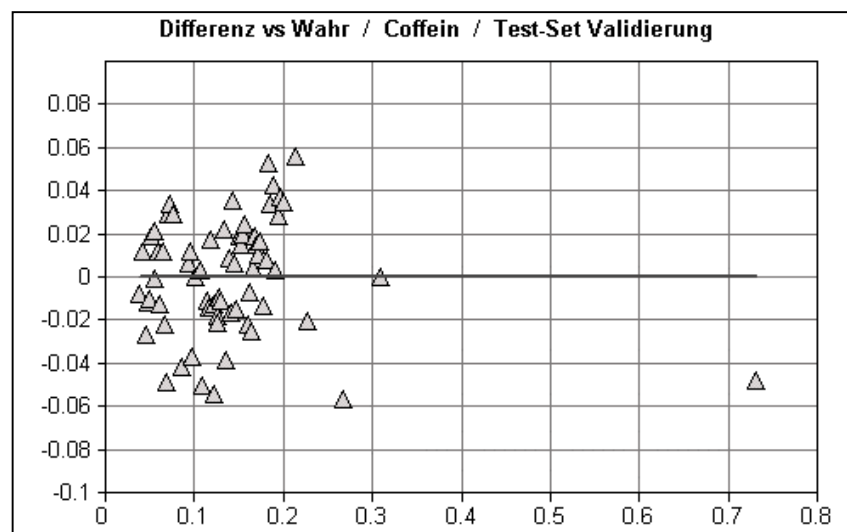


Abbildung 58: Testset; Gegenüberstellung der Referenzwerte in entcaffiniertem Grüntee [% Coffein] (X-Achse) und der Differenzen der NIR-Vorhersagen zu den HPLC-Werten [% Coffein] (Y-Achse)

Die Methode zur Quantifizierung des Coffeingehaltes in entcoffeiertem Grüntee ist im Gegensatz zu den Bestimmungen der Flavanole, des Theobromins, Theogallins und der Gallussäure nicht in der Routineanalytik einsetzbar, da die hier erreichten Vorhersagefehler eine zu ungenaue Bestimmung bedeuten würden.

3.6.12 Die Kalibrationen zur Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in nicht entcoffeiertem Grüntee

Die Kalibrierungen der nicht entcoffeierten Grüntees weisen trotz der meist höheren Analytkonzentrationen schlechtere Ergebnisse auf. Nur 149 Muster der ursprünglich 480 Proben sind nicht entcoffeierte Grüntees. 119 Proben wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktion verwendet, die anderen 30 Proben bilden das Testset. Auch hier wurde wieder auf die gleichmäßige Verteilung der Proben bezüglich der verschiedenen Anbaugebiete und Teesorten sowie der jeweiligen Analytgehalte auf die Kalibrierung und das Testset geachtet. Die Mittelwerte der Analytgehalte sind bei beiden Probensätzen nahezu gleich (Tab. 56) und auch die Gehaltsspanne der Kalibration ist weiter gefasst als beim Testset.

Tabelle 56: Verteilung der Referenzwerte der untersuchten Substanzen auf das Testset und den Kalibriersatz bei nicht entcoffeiertem Grüntee

Substanz	Konzentrations- spanne Kalibrierung [% Analyt]	Mittelwert der Referenzwerte der Kalibrierung [% Analyt]	Konzentrations- spanne Testset [% Analyt]	Mittelwert der Referenzwerte des Testsets [% Analyt]
Theogallin	0,1199 – 3,5930	0,8779	0,2049 – 3,3490	0,8817
Gallussäure	0,0131 – 0,1786	0,0884	0,0295 – 0,1232	0,0889
Theobromin	0,0165 – 0,2170	0,0745	0,0252 – 0,2002	0,0781
Epigallocatechin	1,5950 – 4,7890	2,4948	1,8310 – 3,7300	2,5485
Epicatechingallat	0,7025 – 7,6710	1,6837	0,7849 – 6,2440	1,6677
Epigallocatechin- gallat	2,5400 – 8,0250	5,4164	2,9650 – 7,9081	5,4997
Epicatechin	0,4680 – 2,7971	0,8042	0,5114 – 2,4141	0,7936
Catechin	0,0270 – 0,7574	0,1145	0,0378 – 0,5912	0,1195
Coffein	0,7311 – 4,2090	2,3281	1,2320 – 3,7141	2,3170

Die Parameter Datenvorbehandlung und Frequenzbereiche können Tabelle 22 entnommen werden, da die optimalen Einstellungen auch hier mit denen der Gesamtkalibrierungen übereinstimmen. Die geeignete Anzahl Ranks wurde über den geringsten RMSECV bei der Kreuzvalidierung ermittelt (Tab. 57).

Die Vorhersagefehler RMSECV der Kreuzvalidierungen stimmen bei den meisten untersuchten Teeinhaltsstoffen gut mit dem RMSEP der Testsets überein (Tab. 57). Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist bei allen Substanzen, außer bei Theogallin, Coffein, Epicatechin und Epicatechingallat deutlich unter 90 %. Das bedeutet, dass ein großer Teil der Datenvarianz nicht durch die Kalibrierfunktionen erklärbar ist.

Tabelle 57: Die statistischen Parameter der Kalibrationen (aus entcoffeynierten Grüntees) zur Bestimmung der Teeinhaltsstoffe im nicht entcoffeynierten Grüntee

Substanz	Anzahl Ranks	Kalibration		Testset			
		R^2 [%]	RMSECV [% Analyt]	R^2 [%]	RMSEP [% Analyt]	MW [% Analyt]	RMSEP auf den MW bezogen [%]
Theogallin	7	97,05	0,110	98,49	0,082	0,8817	9,30
Gallussäure	8	82,2	0,010	79,7	0,010	0,0889	11,25
Theobromin	11	81,14	0,017	91,66	0,012	0,0781	15,37
Epigallocatechin	5	71,07	0,212	76,67	0,250	2,5485	9,67
Epicatechingallat	6	93,11	0,280	91,34	0,273	1,6677	16,37
Epigallocatechin-gallat	7	83,28	0,458	81,02	0,450	5,4997	8,18
Epicatechin	9	90,56	0,111	94,22	0,081	0,7936	10,21
Catechin	7	85,20	0,041	88,92	0,035	0,1195	29,29
Coffein	8	95,74	0,127	96,82	0,108	2,3170	4,66

Wird der RMSEP betrachtet (Tab. 53 und 57), wird deutlich, dass sich der Fehler bei nur vier Substanzen gegenüber der Gesamtkalibrationen verringert hat und nun unter 10 % liegt. Bei den anderen Inhaltsstoffen ist die Vorhersage der nicht entcoffeynierten Grüntees mit einer Kalibrierung, die auch entcoffeynierte Grüntees enthält, bedeutend besser. Bei der Bestimmung des Catechins betrug der Fehler bei der Gesamtkalibrierung 21,61 % und ist nun bei der Methode der nicht entcoffeynierten Grüntees auf 29,29 % gestiegen.

Aus Abbildung 59 kann die starke Streuung der Werte der Kalibrierung für EGCG entlang der Winkelhalbierenden erkannt werden, die das schlechte Bestimmtheitsmaß und auch den hohen RMSECV begründet, obwohl hier der Konzentrationsbereich homogen abgedeckt wird und die Gehaltsspanne deutlich im Prozentbereich liegt und damit gut mit der NIRS bestimmbar sein sollte. Da aber eine Methode, bei der die Varianz der Daten durch die Kalibrierfunktion nur schlecht erklärt wird, keine genaue und zuverlässige Quantifizierung des Testsets ermöglicht, kann die Methode nicht für die Quantifizierung unbekannter Proben eingesetzt werden.

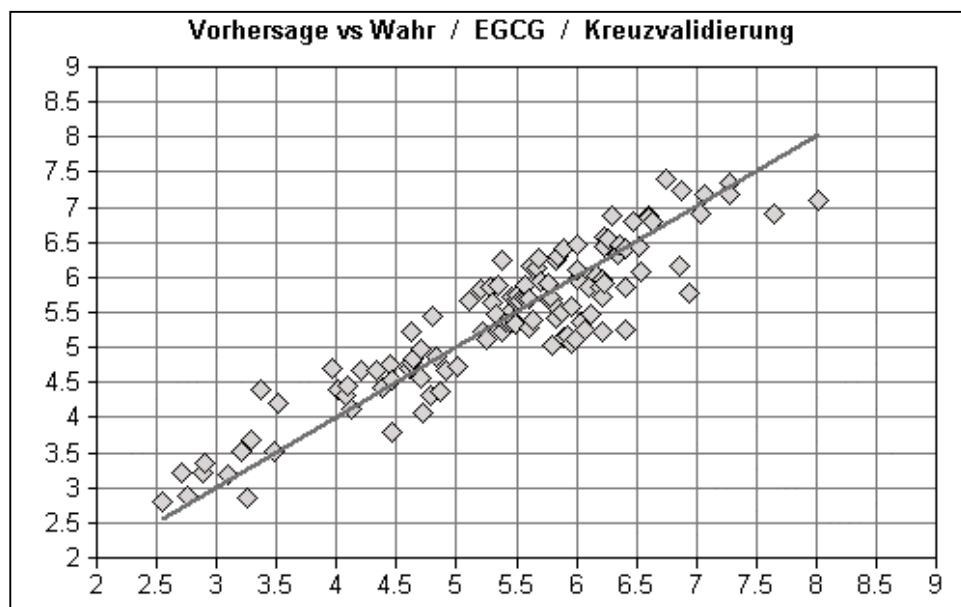


Abbildung 59 : Kalibrierung zur Bestimmung des Gehaltes an EGCG in nicht entcoffeiertem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte [% EGCG] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% EGCG] (Y-Achse)

Da die Korrelation der Daten bei den entcoffeierten Grüntees durchweg gut war, kann die Abnahme der Richtigkeit bei den nicht entcoffeierten Tees auch an der Anzahl der Kalibrier- und Testsetproben liegen. Bereits bei den entcoffeierten Schwarztees konnte gezeigt werden, dass eine Erweiterung des Modells die Kalibrierung verbessern kann.

119 Proben sind offensichtlich nicht ausreichend, um die Varianzen einer pflanzlichen Matrix zu erfassen. Die Beurteilung einer Methode anhand von nur 30 Testsetproben liefert ebenso keine verlässlichen Aussagen über die Robustheit und Richtigkeit des Modells. Somit müssen die statistischen Parameter der Kalibrierungen zur Bestimmung von Coffein, Theogallin, Epigallocatechin und EGCG, die auf eine zuverlässige und genaue Bestimmung der Analyten schließen lassen, vorsichtig beurteilt werden.

Die Vorhersagefehler dieser vier Analyten liegen, außer beim Coffein, nur wenig unter der 10 % - Fehlergrenze. Bei einer Erweiterung der Kalibrierung und des Testsets könnten sich die Vorhersagefehler vergrößern, wenn dadurch auch die Anzahl der Matrixvarianzen erhöht wird.

Der Vorhersagefehler der Coffeinkalibration liegt mit 4,66 % sogar unter 5 % .Der RMSEP von 0,108 % Coffein ist mit dem der Gesamtkalibration von 0,102 % Coffein fast identisch. Der relative Fehler ist nur aufgrund des Wegfalls der geringen Coffeinkonzentrationen der entcaffeinerten Proben gesunken. Bei den höheren Werten wird die Coffeinbestimmung mit einem relativen Fehler von weniger als 5 % möglich.

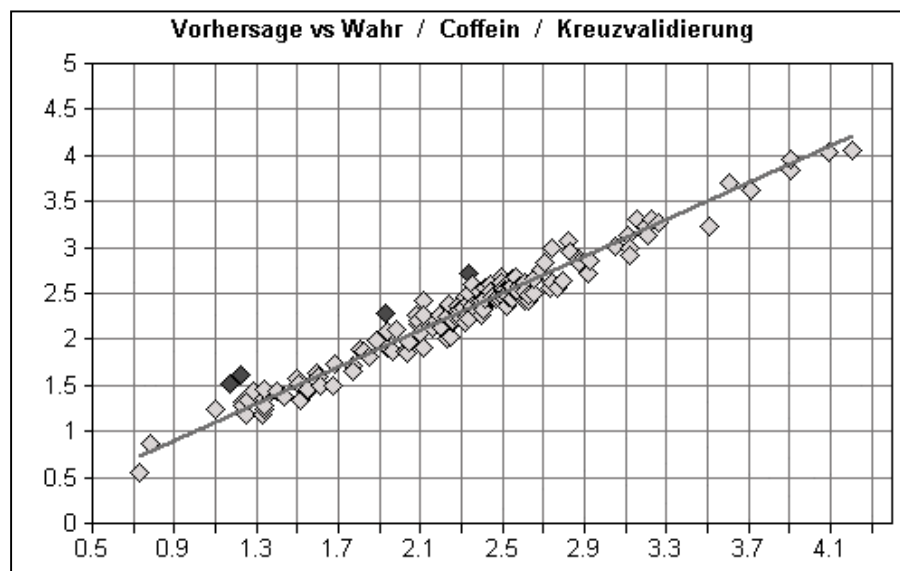


Abbildung 60: Kalibrierung zur Bestimmung des Coffeingehaltes in nicht entcaffeinertem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte HPLC [% Coffein] (X-Achse) und der NIR-Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

Die Streuung der Kalibrierproben (Abb. 60) ist deutlich geringer als bei den entcaffeinerten Proben (vgl. Abb. 57). Dies ist auch bei den Testsetproben auffallend (Abb. 61). Die Bestimmung der nicht entcaffeinerten Grüntees ist mit der vorliegenden Methode möglich.

Der Variationskoeffizient bei der Ermittlung der Präzision (Tab. 58) liegt für die Coffeinbestimmung mit dem NIR mit 3,50 % etwas höher als der Variationskoeffizient der HPLC - Methode mit 2,64 %, aber deutlich unter dem VK der Gesamtkalibration und der Methode zur Coffeinbestimmung in entcaffeinertem Grüntee (vgl. Tab. 55).

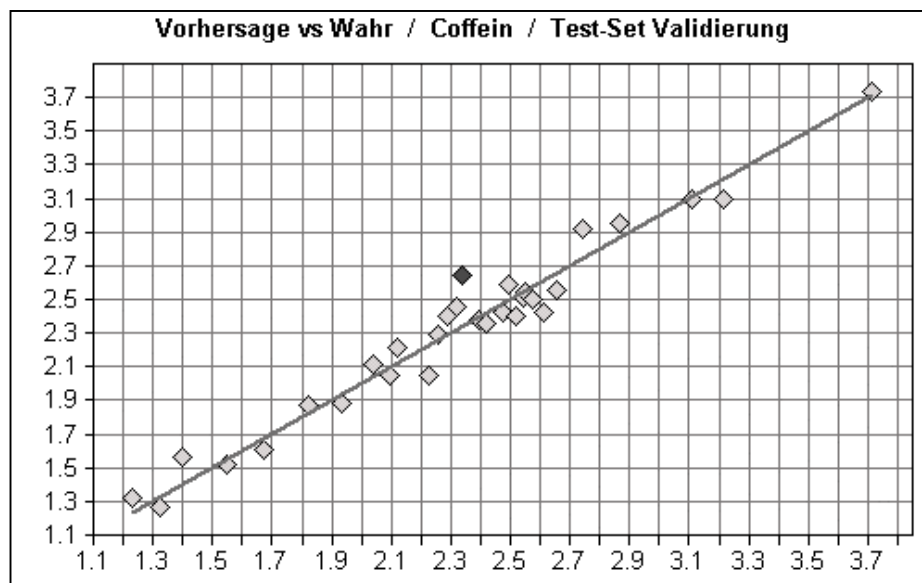


Abbildung 61: Testset zur Bestimmung des Coffeingehaltes in nicht entcaffeinierem Grüntee; Gegenüberstellung der Referenzwerte HPLC [% Coffein] (X-Achse) und der NIR- Vorhersagen [% Coffein] (Y-Achse)

Tabelle 58: Vergleich der Präzision der Bestimmung von Coffein in nicht entcaffeinierem Grüntee mittels NIRS und HPLC

s [% Coffein]	MW [% Coffein]	VK (NIR) [%]	VK (HPLC) [%]
0,0819	2,34	3,50	2,64

Die Ergebnisse der Kalibrierung des nicht entcaffeinierem Grüntees entsprechen bei der Coffeinbestimmung soweit den gestellten Anforderungen. Doch durch die geringe Probenanzahl des Testsets muß auch hier die Übertragbarkeit der Resultate auf die Proben, die in der Routineanalytik zu untersuchen sind, vorsichtig eingeschätzt werden. Die Entwicklung der Methode zur Restcoffeingehaltsbestimmung hat deutlich gezeigt, dass Kalibrierungen mit einer so geringen Probenanzahl den Anforderungen im Routinebetrieb nicht gewachsen sind. Deshalb sollten die Kalibrierungen zur Bestimmung des Coffeins, Theobromins, Theogallins, der Gallussäure und der Flavanole in nicht entcaffeinierem Grüntees vor einer abschließenden Beurteilung noch über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Prinzipiell wurde jedoch deutlich, dass auch bei den Grüntees die Aufteilung der Proben in Kalibrierungen für entcaffeinierem bzw. nicht entcaffeinierem Tee bessere Ergebnisse liefert als gemeinsame Methoden für beide Grünteearten.

3.6.13 Zusammenfassung der getrennten Kalibrierungen Grüntee

Im Falle von entcoffeiertem Grüntee entsprechen die Kalibrationen alle den Anforderungen und können zur Bestimmung der angeführten Inhaltsstoffe herangezogen werden. Bei den nicht entcoffeierten Grüntees sollten die Testsets und Kalibrierungen erweitert werden, um zuverlässigere Methoden zu erhalten und besser einschätzen zu können, inwieweit eine exakte Quantifizierung möglich ist. Bei einigen Analyten, wie z.B. dem Coffein, ist dies sicher möglich. Da jedoch durch geringe Probenanzahlen keine zuverlässige Einschätzung der Methoden möglich ist, wie bei der Kalibrierung zur Restcoffeingehaltsbestimmung in entcoffeiertem Schwarztee nach Davies et al. [62] deutlich wurde, sollten auch hier die Ergebnisse nur als vorläufig gewertet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien

4.1.1 Standards für die HPLC-Bestimmungen

- Coffein R: Fa. Merck, Charge: K 912 195 184 006; Coffein R rein
- Theobromin: Fa. Merck, Charge: K 725 893 468 003; Theobromin R rein

4.1.2 Sonstige Chemikalien

- Maßlösung 0,1 N NaOH: Fa. Merck, Charge: OC 065519
- EDTA: Ethylendiamintetraacetic acid disodium salt, dihydrate
Fa. Sigma; Charge: 18 H 06551
- L- (+) -Ascorbinsäure: Fa. Merck, Charge: 100 1270 100
- Methanol: Fa. Promochem; HPLC-Qualität
- Essigsäure, 100%: Fa. Merck; reinst; HPLC-Qualität
- Wasser: Umkehrosmose-Wasser

Weitere verwendete Chemikalien p.A. Qualität

4.2 Verwendete Drogen

4.2.1 Hibiscusdrogen

Es wurden Hibiscusblütendrogen „Hibiscus sabdariffa“ der Jahre 1998 bis 2001 verwendet. Der überwiegende Teil stammt aus dem Jahr 1999. Die getrockneten Blüten stammten aus den Anbaugebieten im Sudan, Senegal, China und Thailand. Ein großer Teil der Proben entfiel auf die hochwertige Hibiscus sabdariffa Sorte „El Rahad“.

Die Proben bestanden entweder aus den ganzen getrockneten Blütenkelchblättern oder zerkleinertem Material unterschiedlicher Größen.

4.2.2 Entcoffeinierter Schwarztee

Der entcoffeinierte Schwarztee stammte aus der Produktion der Fa. Plantextrakt, Vestenbergsgreuth aus den Jahren 1997 bis 2000. Die Proben umfassten jeweils 50 g, wovon 20 g vermahlen und zur HPLC- und NIR-Messung verwendet wurden. Die Proben wurden aus entcoffeinierten Schwarzteegebinden von ca. 300 kg gezogen.

Der Schwarztee wurde mittels Ethylacetat-Extraktion entcoffeiniert. Dabei wird der Schwarztee mit wassergesättigtem Ethylacetat versetzt und mehrere Stunden bei Temperaturen von 80 – 105 °C gehalten. Der Tee wird auf einen Gehalt von < 0,4 % bzw. < 0,1 % Coffein extrahiert. Anschließend wird das Lösungsmittel abgelassen und der Tee vom flüchtigen Ethylacetat befreit (Desodorierung). Der Restlösungsmittelgehalt beträgt in der Regel zwischen 1 und 5 ppm. Abschließend wird der Tee auf seinen ursprünglichen Wassergehalt gebracht und verpackt.

4.2.3 Entcoffeinierter Grüntee

Der entcoffeinierte Grüntee stammt aus den Jahren 1997 bis 2000.

Die Entcoffeinierung des Grünen Tees erfolgt mittels Extraktion mit überkritischem CO₂. Dazu wird der Tee mit dem überkritischen Gas versetzt und bei 40-80 °C und einem Druck von 20 - 30 MPa mehrere Stunden entcoffeiniert. Der Grüntee wird meist bis zu einem Gehalt von < 0,2 % oder < 0,1 % Coffein extrahiert. Nach der Extraktion wird das selektiv entfernte Coffein mit Wasser wieder aus dem CO₂ mittels Aktivkohle herausgewaschen. Dies ist bei der Extraktion mit Ethylacetat nicht möglich, da dort Coffein nicht selektiv extrahiert wird, sondern neben Flavanolen, Thearubigenen und Theaflavin auch andere Teeinhaltsstoffe extrahiert werden.

4.2.4 Schwarz- und Grüntee

Der Grün- und Schwarztee, der keiner Extraktion zugeführt wurde, stammt ebenso aus den Jahren 1997 bis 2000 aus der Produktion der Fa. Plantextrakt, Vestenbergsgreuth.

4.3 Referenzmethoden

4.3.1 Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung des Coffeingehaltes in Teedrogen mittels HPLC

Methode:

Die Inhaltsstoffe werden mittels HPLC aufgetrennt und mit Coffein als Referenzsubstanz quantifiziert [66].

- Untersuchungslösung:

In eine 500 ml Flasche werden 1,00 g gemahlene (Vermahlung siehe Kap. 4.4.3) Teedroge (genau gewogen) mit $4,5 \pm 0,5$ g Magnesiumoxid und 300 ml Wasser versetzt. Das Gesamtgewicht der verschlossenen Flasche wird bestimmt und das Gemisch zunächst 5 Minuten, nach kurzem Schütteln weitere 15 Minuten, im Schüttelwasserbad bei 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Gesamtgewicht erneut bestimmt und sollte mit dem ersten Ergebnis übereinstimmen. Überschreitet die Gewichtsabweichung 0,5 g, muß die Extraktion wiederholt werden. Bei entcaffeinerten Teedrogen wird nach Zentrifugieren und Membranfiltration diese Lösung als Untersuchungslösung in die HPLC injiziert. Bei nicht entcaffeinerten Teedrogen erfolgt dies erst nach Verdünnung von 1:10 mit Wasser.

- Referenzstandardlösungen:

- Stammlösung Coffein: 125,0 mg Coffein (genau gewogen) werden mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (1+4; V/V) auf 250,0 ml aufgefüllt.
- Standardlösungen Coffein: Die Coffein-Stammlösung wird mit Wasser verdünnt und in Konzentrationen von ca. 3,0 mg/100 ml; 2,0 mg/100 ml; 1,0 mg/100 ml; 0,5 mg/100 ml; 0,25 mg/100 ml und 0,05 mg/100 ml in die HPLC injiziert.

Geräte:

- HPLC-System: Fa. Waters, Milford, Massachusetts
- HPLC-Pumpen: Modell 515
- Säulenofen: Thermostat STH 585 Gynkotek
- Autosampler: Modell W 717
- Detektor: Tunable Absorbance Detektor Modell W 2487
- Degaser: Metallfreier Degaser Typ 234
- Software: Millennium 32

- Säule: Hypersil ODS, 5 µm; 125 x 4 mm
- Fließmittel: Wasser/Methanol (70:30; V/V)
- Messprogramm: isokratisch
 - Injektionsvolumen: 10 µl
 - Flussrate: 0,6 ml/min
 - Laufzeit: 9 min
 - Detektion: Absorption im UV-Licht bei 272 nm
 - Säulentemperatur: 40 °C

- **Berechnung der Gehalte:**

Die Berechnung geschieht automatisch über die Chromatographie-Software. Die Retentionszeit von Coffein liegt bei 3,6 bis 5 Minuten.

Die Gehalte des Coffeins werden direkt durch Einsetzen der Peakflächen in die Regressionsgerade berechnet. Die Coffeingehalte für nicht entcaffeinerten Tee werden über Gleichung 4.1 berechnet. Analog erhält man die Gehalte für entcaffeinerten Tee über Gleichung 4.2.

$$G = \frac{c \cdot 3}{m} \cdot \left[\frac{100}{100 - TV} \right] \quad (\text{Gl. 4.1})$$

$$G = \frac{c \cdot 3}{m \cdot 10} \cdot \left[\frac{100}{100 - TV} \right] \quad (\text{Gl. 4.2})$$

G = Gehalt des Coffeins in der Teedroge [%]

c = Konzentration des Coffeins in der Untersuchungslösung [mg/100ml]

m = Einwaage der Teedroge [g]

TV = Trocknungsverlust

4.3.2 Quantifizierung von Coffein, Theobromin, Theogallin, Gallussäure und den Catechinen mittels HPLC

Methode:

Interne Prüfvorschrift der Fa. PhytoLab, Vestenbergsgreuth, zur quantitativen Bestimmung von Catechinen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grüntee per HPLC [67]: Die Inhaltsstoffe der Teedrogen werden mittels HPLC aufgetrennt. Über den externen Standard Theobromin wird Theobromin quantifiziert, die anderen Substanzen und Coffein werden über den externen Standard Coffein bestimmt. Zur Peakzuordnung wird ebenso ein Tee-Extrakt analysiert.

- Untersuchungslösung:

0,20 g Teedroge (genau gewogen) werden mit 5 ml erwärmten Methanol (70 %, v/v) 10 Minuten im Wasserbad bei 70 °C extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand dekantiert, die Probe erneut mit 5 ml erwärmtem Methanol (70 %, v/v) versetzt und im Wasserbad für weitere 10 Minuten, unter gelegentlichem Schütteln, erhitzt. Der Überstand wird nach dem Zentrifugieren mit dem ersten Extrakt vereinigt und mit Methanol (70 %, v/v) auf 10,0 ml aufgefüllt. Nach einer 1:5 Verdünnung mit der Stabilisierungslösung (siehe unten) und Filtration durch einen Membranfilter wird diese Lösung als Untersuchungslösung in die HPLC injiziert.

- Referenzstandardlösungen:

- Stammlösung Theobromin: 10,00 mg Theobromin (genau gewogen) werden mit Stabilisierungslösung auf 50,0 ml aufgefüllt.
- Standardlösungen Theobromin: Die Theobromin-Stammlösung wird mit Stabilisierungslösung verdünnt und in Konzentrationen von ca. 2,0 mg/100 ml; 1,0 mg/100 ml; 0,5 mg/100 ml; 0,05 mg/100 ml; 0,01 mg/100 ml; 0,001 mg/100ml in die HPLC injiziert.
- Stammlösung Coffein: 20,00 mg Coffein (genau gewogen) werden mit Stabilisierungslösung auf 50,0 ml aufgefüllt.
- Standardlösungen Coffein: Die Coffein-Stammlösung wird mit Stabilisierungslösung verdünnt und in Konzentrationen von ca. 36,0 mg/100 ml; 20,0 mg/100 ml; 4,0 mg/100 ml; 1,0 mg/100 ml; 0,1 mg/100 ml; 0,01 mg/100ml in die HPLC injiziert.

- Stabilisierungslösung: 0,25 g EDTA + 0,25 g L-Ascorbinsäure in 500 ml Wasser gelöst, 100 ml Acetonitril zugefügt und mit Wasser auf 1,0 l aufgefüllt.

Geräte: Binäres Hochdruckgradientensystem

- HPLC-System: Fa. Waters, Milford, Massachusetts
- HPLC-Pumpen: Modell 515
- Säulenofen: Thermostat STH 585 Gynkotek
- Autosampler: Modell 717 plus
- Detektor: Modell 996 PDA Dimensions (190 – 800 nm)
- Degaser: Metallfreier Degaser Typ 234
- Software: Millennium 32
- Säule: Luna Phenyl-Hexyl 5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex
- Fließmittel: A: 180 ml Acetonitril + 40 ml Essigsäure (100%, v/v) mit Wasser ad 2,0 l
B: 800 ml Acetonitril mit Wasser ad 1,0 l
- Messprogramm:
 - Injektionsvolumen: 10 µl
 - Flussrate: 1,0 ml/Min
 - Laufzeit: 60 Min.
 - Detektion: Absorption im UV-Licht bei 278 nm
 - Säulentemperatur: 35 °C
 - Gradient:

Tabelle 59: Gradientenschema

Zeit [Min]	Fließmittel A	Fließmittel B
0	100	0
10	100	0
25	68	32
32	68	32
40	100	0
60	100	0

- Retentionszeiten: Theobromin eluiert bei ca. 6 Minuten, Coffein bei etwa 15-16 Minuten

Tabelle 60: Retentionszeiten und Responsefaktoren der untersuchten Teeinhaltsstoffe

Substanz	Retentionszeit [Min]	Relative Retentionszeit bzgl. Coffein	Responsefaktoren
Theogallin	4,0	0,25	3,880
Gallussäure	4,3	0,27	0,853
Epigallocatechin	8,5	0,54	13,700
Catechin	11,1	0,70	3,880
Epicatechin	18,3	1,15	3,710
Epigallocatechingallat	20,5	1,29	1,960
Epicatechingallat	26,3	1,65	1,670

- **Berechnung der Gehalte:**

Die Berechnung geschieht automatisch über die Chromatographie-Software.

Die Gehalte der einzelnen Substanzen werden zunächst als Coffein berechnet und anschließend über die Responsefaktoren die tatsächlichen Gehalte ermittelt.

$$G = \frac{c}{m \cdot 20} \cdot R \quad (\text{Gl. 4.3})$$

G = Gehalt des Catechins, Theogallins, der Gallussäure in der Teedroge [%]

c = Konzentration der jeweiligen Substanz in der Untersuchungslösung berechnet als

Coffein [mg/100 ml]

m = Einwaage der Teedroge [g]

R = Responsefaktor der jeweiligen Substanz (Tab. 60)

Die Gehalte des Theobromins werden direkt durch Einsetzen der Peakflächen in die Regressionsgerade berechnet.

$$G = \frac{c}{m \cdot 20} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

G = Gehalt des Theobromins in der Teedroge [%]

c = Konzentration des Theobromins in der Untersuchungslösung [mg/100ml]

m = Einwaage der Teedroge [g]

Anmerkung:

Da die verwendeten Teedrogen über einen Zeitraum von 2 Jahren gesammelt wurden, und die TV-Bestimmung über eine Schnellmethode erfolgte, wurde bei der Berechnung der Gehalte der TV nicht mit einberechnet. Die Gehaltswerte sind somit nicht auf den TV bezogen.

4.3.3 Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung des Säuregehaltes von Hibiscusblüten mittels TitrationMethode:

- Titration zur quantitativen Bestimmung des Säuregehaltes, berechnet als Citronensäure, von Hibiscusblüten nach DAB 1997, Monographie „Hibiscusblüten“ [14]
- Doppelbestimmung

Geräte:

- Der Endpunkt der Titration bei pH = 7,00 wird mit dem pH - Meter Delta 3450 der Fa. Mettler bestimmt
- 25 ml Bürette; Ex: 30 sec; $\pm 0,03$ ml; 1/20 ml Unterteilung

4.3.4 Referenzmethode zur Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusblüten mittels UV/VIS-SpektroskopieMethode:

- Bestimmung des Färbevermögens von Hibiscusblüten mittels UV/VIS-Spektroskopie nach DAB 1997, Monographie „Hibiscusblüten“ [14]
- Absorptionsmessung bei 520 nm
- Doppelbestimmung

Geräte:

- UV/VIS-Spektralphotometer: Hewlett Packard HP 8453
- Software: HP UV-Visible Chemstation
- Küvetten: Makro-Küvetten Nr. 1101 der Fa. Ratiolab

4.4 NIR-Methoden

4.4.1 Allgemeine Daten des NIR-Spektrometers

NIR-Spektrometer:	Vector 22 NIR, Fa. Bruker Optik, Ettlingen
Auflösung:	8 cm ⁻¹
Lichtquelle:	Wolfram-Halogenlampe
Laser:	He-Ne-Laser, Wellenlänge: 633 nm
Beamsplitter:	Quarz
Interferometer:	Mechanisches Interferometer mit „Rocksolid alignment“
Detektor:	PbS

4.4.2 Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Anzahl Scans auf die Quantifizierung

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	30 entcoffeinierte Schwarzteeproben
Gehaltsspanne [% Coffein]:	0,02 - 0,42
Mittelwert Gehalt [% Coffein]:	0,15
Datenvorbehandlung:	Vektornormierung
Anzahl Ranks:	8
Frequenzbereiche [cm ⁻¹]:	6253 - 5396,7 & 4848,9 - 3822,8
Referenzmethode:	HPLC (vgl. Kap. 4.3.1)
Anzahl Scans pro Messung:	je nach Methode variierend (vgl. Kap. 3.1.1)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.1.1 zu entnehmen. Bei allen nachfolgend aufgeführten NIR-Methoden wurden die Leerkanal- und die Probenmessung mit jeweils 16 Scans aufgenommen.

4.4.3 Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Partikelgröße

Vermahlen der Proben:	- Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm - IKA-Schlagmühle
Kalibrierproben:	50 Hibiscusdrogen (vgl. Kap. 4.2)
Gehaltsspanne [% Citronensäure]:	12,68 - 17,38
Mittelwert Gehalt [% Citronensäure]:	15,14
Datenvorbehandlung:	MSC
Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	7503 – 4247,2
Anzahl Ranks:	5
Referenzmethode:	Titration (vgl. Kap. 4.3.3)

Verwendete Mühlen zur Probenvorbereitung:

- **Fritsch-Zentrifugalmühle:** Fritsch pulverisette 14
14 000 – 16 000 rpm (Umdrehungen pro Minute)
Sieb: 0,2 mm
- **IKA-Schlagmühle:** IKA A 10
20 000 rpm

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.1.2 zu entnehmen.

4.4.4 Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses der Packungsdichte der Probe

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	50 Hibiscusdrogen (vgl. Kap. 4.2 und 4.4.3)
Gehaltsspanne [% Citronensäure]:	12,68 - 17,38
Mittelwert Gehalt [% Citronensäure]:	15,14
Datenvorbehandlung:	MSC

Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	7503 – 4247,2
Anzahl Ranks:	5
Referenzmethode:	Titration (vgl. Kap. 4.3.3)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen sind dem Ergebnisteil in Kapitel 3.1.3 zu entnehmen.

4.4.5 NIR-Methode zur Bestimmung des Restcoffeingehaltes in entcoffeiniertem Schwarztee

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	500 entcoffeinierte Schwarzteeeproben
Gehaltsspanne [% Coffein]:	0,02 - 0,60
Mittelwert Gehalt [% Coffein]:	0,3
Datenvorbehandlung:	Vektornormierung
Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	6253 - 5396,7 & 4848,9 - 3822,8
Anzahl Ranks:	13
Referenzmethode:	HPLC (vgl. Kap. 4.3.1)

Testset:

Proben:	99 entcoffeinierte Schwarzteeeproben
Gehaltsspanne [% Coffein]:	0,02 - 0,47
Mittelwert Gehalt [% Coffein]:	0,29
Referenzmethode:	HPLC (vgl. Kap. 4.3.1)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.2 zu entnehmen.

4.4.6 NIR-Methode zur Bestimmung des Coffeingehaltes in (nicht entcoffeiertem) Schwarztee

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	145 Schwarzteeeproben
Gehaltsspanne [% Coffein]:	1,46 - 4,09
Mittelwert Gehalt [% Coffein]:	2,74
Datenvorbehandlung:	MSC
Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	6253 - 5396,7 & 4848,9 - 3822,8
Anzahl Ranks:	7
Referenzmethode:	HPLC (vgl. Kap. 4.3.1)

Testset:

Proben:	37 Schwarzteeeproben
Gehaltsspanne [% Coffein]:	1,63 - 3,95
Mittelwert Gehalt [% Coffein]:	2,75
Referenzmethode:	HPLC (vgl. Kap. 4.3.1)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.3 zu entnehmen.

4.4.7 NIR-Methode zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	406 Hibiscusdrogen
Gehaltsspanne [% Citronensäure]:	9,51 - 17,8
Mittelwert Gehalt [% Citronensäure]:	15,31
Datenvorbehandlung:	Subtraktion einer geraden Linie
Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	7503 - 4247,2
Anzahl Ranks:	10
Referenzmethode:	Titration (vgl. Kap. 4.3.3)

Testset:

Proben:	104 Hibiscusdrogen
Gehaltsspanne [% Citronensäure]:	10,33 - 17,53
Mittelwert Gehalt [% Citronensäure]:	15,36
Referenzmethode:	Titration (vgl. Kap. 4.3.3)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.4 zu entnehmen.

4.4.8 NIR-Methode zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen

Vermahlen der Proben:	Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm
Kalibrierproben:	406 Hibiscusdrogen
Gehaltsspanne [Absorptionseinheiten]:	0,0330 - 0,7953
Mittelwert Gehalt [Absorptionseinheiten]:	0,3291
Datenvorbehandlung:	Vektornormierung
Frequenzbereiche [cm^{-1}]:	6476,9 - 5446,9 & 4602,1 - 4247,2
Anzahl Ranks:	12
Referenzmethode:	Photometrische Messung (vgl. Kap. 4.3.4)

Testset:

Proben:	104 Hibiscusdrogen
Gehaltsspanne [Absorptionseinheiten]:	0,0630 - 0,6800
Mittelwert Gehalt [Absorptionseinheiten]:	0,3265
Referenzmethode:	Photometrische Messung (vgl. Kap. 4.3.4)

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.5 zu entnehmen.

4.4.9 NIR-Methoden zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grüntee

Verwendet wurden nicht extrahierte Grüntees und CO₂-entcoffeinierte Grüntees (vgl. Kapitel 4.2). 383 Grünteeproben sind in der Kalibrierung, 97 Proben im Testset enthalten.

Referenzmethode: HPLC (vgl. Kap. 4.3.2)

Vermahlung: Fritsch-Zentrifugalmühle, Sieb: 0,2 mm

Die eingesetzten Datenvorbehandlungen und Frequenzbereiche der einzelnen Substanzen sind Tabelle 22 zu entnehmen. Die Gehaltsbereiche und Mittelwerte der Analytkonzentrationen sind in Kapitel 3.6 aufgeführt.

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil in den Kapiteln 3.6 zu entnehmen.

4.4.10 NIR-Methoden zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in entcoffeiniertem Grüntee

Verwendet wurden ausschließlich Grüntees, die mittels CO₂-Extraktion entcoffeiniert wurden (vgl. Kapitel 4.2). In der Kalibrierung sind 265 Proben, im Testset 66 Grüntees enthalten.

Die eingesetzten Datenvorbehandlungen und Frequenzbereiche der einzelnen Substanzen sind mit denen der Gesamtkalibration identisch und sind Tabelle 22 zu entnehmen. Die Gehaltsbereiche und Mittelwerte der Analytkonzentrationen sind in Kapitel 3.6 aufgeführt.

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind dem Ergebnisteil im Kapitel 3.6 zu entnehmen. Ebenso ist die Referenzmethode und die Vermahlung mit den Angaben von Kapitel 4.4.9 identisch.

4.4.11 NIR-Methoden zur Bestimmung von Flavanolen, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in nicht entcaffiniertem Grüntee

Verwendet wurden ausschließlich nicht entcaffinierte Grüntees (vgl. Kapitel 4.2). In der Kalibrierung sind 119 Proben, im Testset 30 Grüntees enthalten.

Die eingesetzten Datenvorbehandlungen und Frequenzbereiche der einzelnen Substanzen sind mit denen der Gesamtkalibration identisch (vgl. Kap. 4.4.9) und sind Tabelle 22 zu entnehmen. Die Gehaltsbereiche und Mittelwerte der Analytkonzentrationen sind in Kapitel 3.6 aufgeführt.

Die statistischen Ergebnisse der Kalibrierungen und Beurteilungen sind im Ergebnisteil im Kapitel 3.6 erläutert. Die Referenzmethode und die Vermahlung sind den Angaben von Kapitel 4.4.9 zu entnehmen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Nah – Infrarot – Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung von pflanzlichen Inhaltsstoffen einzusetzen. Es sollte geprüft werden, ob die Restcoffeingehaltsbestimmung im entcoffeinierten Schwarztee, die Coffeinbestimmung im Schwarztee, die Bestimmung von Coffein, Flavanolen, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grüntee und die Bestimmung des Säuregehaltes und des Färbevermögens von Hibiscusdrogen mittels NIR-Technik möglich ist.

Eine bereits bestehende Kalibrierung zur Coffeinbestimmung im entcoffeinierten Schwarztee, die den Anforderungen an Richtigkeit und Robustheit nicht gerecht wurde, sollte überprüft werden und eine neue funktionsfähige Methode erstellt werden. Bei der Überprüfung der vorhandenen Methode hat sich gezeigt, dass eine Vermischung entcoffeinierter und nicht entcoffeinierter Tees in der Kalibrierung die Richtigkeit und die Robustheit der NIR - Bestimmung verschlechtert. Dies trifft auch für die Bestimmung der untersuchten Inhaltsstoffe in Grüntee (Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure) zu. Unabhängig davon, ob Coffein mittels Ethylacetat oder überkritischem CO₂ extrahiert wird, erfährt die Teematrix bei der Entcoffeinierung eine so starke Veränderung, dass eine gemeinsame Kalibrierung des entcoffeinierten und nicht entcoffeinierten Tees nicht ohne erhebliche Einbußen der Richtigkeit und Robustheit der Methode möglich ist (vgl. S. 136f).

Im Rahmen der Produktionsüberwachung sollten mittels der NIR-Technik mit wenig Zeit- und Arbeitsaufwand entcoffeinierte Schwarzteeproben auf deren Restcoffeingehalt untersucht werden. Dabei muß überprüft werden, ob der zulässige Grenzwert von 0,1 % bzw. 0,4 % Coffein eingehalten wurde. Die Bestimmung des Coffeingehaltes ist bei Proben < 0,4 % Coffein nur mit Einschränkungen möglich. Ab einem Coffeingehalt von 0,38 % sollten die Schwarztees mit der HPLC - Referenzmethode nachuntersucht werden. So kann vermieden werden, dass Proben, deren Coffeingehalte nach der HPLC-Methode unterhalb des zulässigen Grenzwertes liegen, nachentcoffeiniert werden, weil die NIR-Werte, aufgrund des Vorhersagefehlers der NIR-Bestimmung, über dem Grenzwert liegen. Weiterhin kann durch die Nachuntersuchung verhindert werden, dass Schwarztee mit überhöhten Coffeingehalten in den Verkauf gelangt. Das Risiko, dass erhöhte Restcoffeingehalte nicht erkannt werden, liegt unter 10 % (s. S. 57f), wenn alle Tees ab einem NIR-Wert von 0,38 % Coffein nachuntersucht werden.

Bei Proben $< 0,1$ % Coffein konnte gezeigt werden, dass weniger als 3 % der Proben (innerhalb von 18 Monaten) überhöhte Coffeinkonzentrationen zeigen, die vom NIRS nicht erkannt wurden, wenn die Proben ab einem NIR-Wert von 0,1 % Coffein mittels HPLC nachuntersucht werden. Für die Bestimmung des exakten Coffeingehaltes reicht die Richtigkeit der Methode bei diesen geringen Analytkonzentrationen nicht aus. Die Grenzwertbestimmung ist jedoch gut möglich. Bei beiden Konzentrationsbereichen kann die NIRS demnach eingesetzt werden. Die HPLC-Analytik kann nicht vollständig ersetzt werden, aber doch zu einem beträchtlichen Teil reduziert werden. Wie in der Einleitung der vorliegenden Arbeit dargelegt wurde, bietet dies sowohl Ersparnisse auf dem Kosten-, als auch auf dem Zeitsektor. Letzteres ist sicher für die Restcoffeingehaltsbestimmung im Rahmen einer Produktionskontrolle entscheidend.

Die Bestimmung von Coffein in nicht entcaffiniertem Schwarztee ist mit einer größeren Richtigkeit, aufgrund der höheren Analytkonzentrationen, möglich, als die Bestimmung in entcaffinierten Schwarztees. Der Fehler (bez. auf den Mittelwert der Proben im Testset) ist mit 3,78 % erheblich niedriger als bei der Restcoffeinbestimmung in entcaffiniertem Schwarztee und damit ist die Methode für die Bestimmung des Coffeingehaltes in Schwarztee sehr gut geeignet. Aufgrund des geringen Probenaufkommens ist eine Beurteilung hinsichtlich der Robustheit der Kalibrierung nicht abschließend möglich. Das Testset bietet mit 37 Proben eine zu geringe Varianz der Teematrix, um die Methode für zukünftige Analysen zuverlässig beurteilen zu können.

Zur Bestimmung des Säuregehaltes in Hibiscusdrogen, einer der beiden Qualitätsparameter in der Hibiscusanalytik, ist die NIRS gut geeignet. Die Methode zur Bestimmung des Säuregehaltes zeigt ein hohes Maß an Richtigkeit (bzgl. der Referenzmethode) und bedingt dadurch nur einen geringen Fehler der NIR-Analytik. Die hohen Säuregehalte in Hibiscusdrogen ermöglichen die NIR-Bestimmung mit einem Fehler von weniger als 1,5 % (bez. auf den Mittelwert der untersuchten Proben). Auch die Präzision der NIR-Messungen ist für eine Schnellmethode, wie die NIRS, sehr gut und entspricht der Präzision der Referenzmethode. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Qualitätsparameter der Hibiscusdrogen mittels NIRS zuverlässig und mit großer Genauigkeit bestimmt werden kann.

Die Bestimmung des zweiten Qualitätsparameters von Hibiscusdrogen, das Färbevermögen der Blüten, ist mittels NIRS mit einem wesentlich höheren Fehler behaftet. Der große Vorhersagefehler der NIR-Bestimmung ist eine Folge der schlechten Korrelation der

Referenzdaten mit den NIR-Daten. Der Grund dafür liegt in der unpräzisen Referenzmethode begründet. Eine unpräzise Referenzmethode ist für die NIRS ungeeignet, da bei der Kalibration die Fehler der Referenzmethode übernommen werden und sich anschließend entsprechend auf die Genauigkeit der NIR-Analytik auswirken. Hinsichtlich der Präzision erwies sich die NIRS bei der Bestimmung des Färbevermögens als die bessere Methode.

Zur Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen wurde bislang die, hier als Referenzmethode verwendete, photometrische Bestimmung nach DAB 1997 eingesetzt. Die geringe Präzision der Methode und die dadurch fehlerhaften Werte konnten offensichtlich akzeptiert werden. Durch die Fehlerfortpflanzung bei der NIR-Analytik ist die Bestimmung mittels NIRS etwas schlechter als die bisher eingesetzte Methode, jedoch weist die NIRS auch Vorteile auf. Die Vorteile sind sowohl in der Zeit- und Kostenersparnis zu sehen, als auch in der größeren Unabhängigkeit des NIRS vom Laborpersonal im Vergleich zur Referenzmethode. Diese Unabhängigkeit der NIRS konnte bei der Coffeinbestimmung in entcaffeinierterem Schwarztee gezeigt werden und konnte dort Fehler der Referenzanalytik aufdecken. Da die Bestimmung des Färbevermögens in Hibiscusdrogen keine exakte Bestimmung erfordert und die Präzision der NIR-Messungen relativ groß ist, ist ein prinzipieller Einsatz der NIRS in diesem Bereich durchaus denkbar. Nach einer entsprechenden Überprüfung und Überarbeitung der photometrischen Bestimmung des Färbevermögens sollte auch die Genauigkeit der NIR-Analytik in diesem Bereich erhöhbar sein.

Zunächst wurden für die NIR-Bestimmung von Coffein, Flavanolen, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grüntee Methoden aus entcaffeinierterem und nicht entcaffeinierterem Tee gemeinsam entwickelt, da durch die Entcaffeinierung mittels CO_2 -Extraktion Coffein selektiv entfernt werden soll, und zunächst angenommen wurde, dass sich die Teematrix vor und nach der Entcaffeinierung beim Grünen Tee nicht wesentlich unterscheidet.

Diese Annahme erwies sich jedoch als falsch. Wie aus Literatur [65] zu entnehmen ist, treten je nachdem, ob die Lagerung von Erdbeeren unter Luft oder CO_2 -angereicherter Atmosphäre stattfindet, Konzentrationsunterschiede bei phenolischen Verbindungen auf. CO_2 hat demnach Einfluss auf die Zusammensetzung der Erdbeeren und damit auf deren Matrix. Bei den Versuchen, die in Literatur [65] beschrieben werden, wurden die Erdbeeren bei max. 40 %-Anteile CO_2 in der Luft gelagert. Bei der Entcaffeinierung mit überkritischem CO_2 könnten noch weitergehende Veränderungen der Matrix auftreten. Dass die Matrix des mit CO_2

entcoffeierte Tees gegenüber dem nicht extrahierten Tees verändert sein muß, ist aus den hier vorgestellten Ergebnissen zu ersehen. Methoden, die beide Modifikationen des Grünen Tees beinhalten, weisen deutlich schlechtere analytische Ergebnisse auf als „sortenreine“ Kalibrationen. Deshalb wurden für entcoffeierte und nicht entcoffeierte Grüntees getrennte Kalibrationen entwickelt.

Für jeden Teeinhaltsstoff erwiesen sich andere Frequenzbereiche und Datenvorbehandlungen als optimal und dadurch wurde für jede Substanz eine eigene Kalibrierung entwickelt. Außer bei der Bestimmung von EGCG weisen alle Methoden, die sowohl entcoffeierte als auch nicht entcoffeierte Grüntees enthalten, Fehler (bzgl. des Mittelwertes der untersuchten Proben im Testset) von über 10 % auf. Für die meisten Kalibrierungen ergab die Trennung eine Verbesserung der Vorhersagefehler und der Robustheit der Bestimmung.

Die Methoden, die ausschließlich entcoffeierte Grüntees enthalten, zeigen bei sieben der neun untersuchten Inhaltsstoffe bei der Bestimmung des jeweiligen Analyten relative Fehler von weniger als 10 %. Auch bei Catechin kann der rel. Fehler von 10,1 % noch akzeptiert werden. Er konnte von 21,6 % der Gesamtkalibration auf 10,1 % gesenkt werden. Nur die Coffeinbestimmung ist aufgrund sehr geringer Analytkonzentrationen mit einem sehr hohen Fehler behaftet, der den Einsatz dieser Methode in der Routineanalytik unmöglich macht.

Bei den Kalibrierungen der nicht entcoffeierten Grüntees war die Probenanzahl zu gering, um abschließend deren Richtigkeit und die Robustheit der Quantifizierung beurteilen zu können. Die Kalibrationen zur Bestimmung von Coffein, EGCG, EGC und Theogallin weisen im Gegensatz zu den Methoden, die auch entcoffeierte Grüntees enthalten, geringere Fehler auf. Die Fehler (bezogen auf den jeweiligen Mittelwert) liegen unter 10 %, bei Coffein sogar weniger als 5 %. Bei den anderen Analyten haben sich die statistischen Parameter im Vergleich zu den Gesamtkalibrierungen jedoch verschlechtert. Eine Prognose über die Richtigkeit der Bestimmung nach einer Erweiterung der Probenanzahl kann aufgrund des geringen Probenaufkommens nicht getroffen werden. Vor einer sicheren Aussage ist der Ausbau der Kalibrationen und ein größeres Testset zur Beurteilung nötig. Bereits bei den entcoffeierten Schwarztees konnte gezeigt werden, dass eine Erweiterung der Kalibrierung die Methode verbessern kann. Die Bestimmung der Teeinhaltsstoffe Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Theobromin und Gallussäure ist ohne eine Erweiterung der Modelle über die Gesamtkalibrationen, die entcoffeierte Grüntees mit einschließen, mit größerer Genauigkeit möglich.

Die Auswahl der Datenvorbehandlung und der Frequenzbereiche kann auf den Fehler der NIR-Bestimmung Einfluss nehmen (siehe Kapitel 3.2.2). Diese beiden Parameter können von der Software automatisch errechnet werden, wenn die meisten anderen Entscheidungen, wie Probenauswahl, Auswahl der Referenzmethode getroffen worden sind. Dabei wird die Datenvorbehandlung und die Frequenzbereiche ermittelt, die den geringsten Vorhersagefehler der Kalibrierung ergeben. Dies stellt den letzten Optimierungsschritt der Kalibrierfunktion dar. Weitaus größeren Einfluss haben, wie in den Kapiteln 3.5 und 3.2.1 gezeigt, jedoch die Richtigkeit und Präzision der Referenzmethode und die Auswahl der Kalibrierproben. Denn bei einer schlechten Korrelation der Spektraldaten mit den Referenzdaten kann auch durch veränderte Datenvorbehandlungen oder Frequenzbereiche keine „gute“ Kalibrierung mit geringem Fehler erhalten werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Probenauswahl und die Referenzmethode den entscheidenden Einfluss auf die NIR-Kalibrierung haben. Darauf muß das Hauptaugenmerk bei der Erstellung einer NIR-Methode liegen. Im pflanzlichen Bereich der Anwendungen der Nah-Infrarot-Spektroskopie ist es nötig, möglichst viele Proben in die Kalibration aufzunehmen, um die gesamte Variabilität der Pflanzenmatrix zu erfassen und spätere Proben zuverlässig bestimmen zu können. Bisher waren softwarebedingt maximal 500 Kalibrierspektren möglich. Neuere NIR-Software-Versionen erlauben inzwischen die Aufnahme von mehreren tausend Kalibrierproben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Quantifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen mehrere hundert Proben erforderlich sind, um eine robuste Methode zu erhalten. Je mehr Proben in der Kalibrierung enthalten sind, desto mehr Varianzen sind dem Modell bekannt und desto robuster ist eine Methode. Dem stehen jedoch erhöhte Kosten und erhöhter Messaufwand entgegen. Eine Probenanzahl von 300 - 500 erscheint bei Abwägung der Kosten gegen den Nutzen als sinnvoll. Diese Zahl ergibt sich aus den Ergebnissen der hier vorgestellten Methoden. Aufgrund der ständigen Erweiterung der Kalibrierung im Zuge der Kalibrierpflege, d.h. bei der Anpassung der Methode an neue Sorten und Ernten, wird die Anzahl der Kalibrierproben weiter steigen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Nah-Infrarot-Spektroskopie eine schnelle und kostengünstige Methode ist, die sich gut zur Quantifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen eignet. Die Bestimmung der Restcoffeingehalte konnte einerseits deutlich machen, dass auch bei sehr geringen Analytkonzentrationen die NIRS einsetzbar ist, andererseits wurden hier auch die Grenzen dieser Analytik erkennbar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Feldheim W.
Tee und Teeerzeugnisse
Blackwell, Berlin, 1994
- [2] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (dge)
Informationen von der Homepage „www.dge.de“ vom Dezember 1999
- [3] Wichtl M.
Teedrogen
2. Auflage, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1989
- [4] Heiss R.
Lebensmitteltechnologie
Springer Verlag, Berlin, 1996
- [5] Belitz H.-D.; Grosch W.
Lehrbuch der Lebensmittelchemie
Springer Verlag, Berlin, 1992
- [6] Römpp Lexikon Lebensmittelchemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995
- [7] Schubert R.; Spiro M. (Hrsg.)
Chemical and biological properties of tea infusions
Umwelt und Medizin Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1997
- [8] Römpp Lexikon
Band 2 und Band 6
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995
- [9] Scholz E.; Bertram B.
Camellia sinensis (L.) O. Kuntze, Der Teestrauch: Inhaltsstoffe und Wirkungen von Grünem und Schwarzem Tee
Zeitschrift für Phytotherapie 17 (199) 235 - 250
- [10] Wang Z. ; Agarwal R.
Carcinogenesis 12 (1991) 1527-1530
- [11] Wang Z. ; Huang M.T.; Ferraro T.; Wong C.Q.; Lon Y.R.; Reuhl K.; Iatropoulos M.; Yang C.S.; Connery A.H.
Cancer Res 52 (1992) 1162-1170
- [12] Fujiki H.; Okuda T.
Drugs fut. 17 (1992) 462-464
- [13] Watzl B.; Leitzmann C.
Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln
Hippokrates, Stuttgart, 1999
- [14] Deutsches Arzneibuch 1997
10. Ausgabe
Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 1997
- [15] PhytoLab-interne Zusammenfassung über Hibiscus sabdariffa, 1992

- [16] Benk E.
Krumbach Alkoholindustrie 10 (1987) 199
No. 18908
- [17] Eggensperger H.; Willer M.
Parfümerie und Kosmetik 77 (1996) 540-543
- [18] Sharaf A.
Planta medica 10 (1962) 48
- [19] Pudelko-Körner C.
Anwendung der NIRS in der Arzneipflanzenanalytik
Dissertation, Bonn, 1997
- [20] Stirn A.
Sabbdariffa-Salbe: Zum Nachweis der Wirksamkeit bei Venopathien und Arthrosen
Z. Allgemeinmed. 54 (1975) 616-619
- [21] Watson C.A.
Near infrared reflectance spectrophotometric analysis of agricultural products
Anal. Chem. 49 (1977) 835A – 840A
- [22] Ebel S. ; Roth H. J. (Hrsg.)
Lexikon der Pharmazie
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1987
- [23] Hesse G.
Anwendungen der quantitativen NIRS in der Arzneimittelherstellung
Unterlagen zum Seminar „Einsatzmöglichkeiten der NIRS in der Herstellung und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln“ veranstaltet vom Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH
am 07./08. Dezember 1999 in Bad Neuenahr
- [24] Wessel E.
Erfahrungen in der NIRS-gestützten Eingangskontrolle von kosmetischen Grund-, Hilfs- und Wirkstoffen,
vorgestellt anhand ausgewählter Praxisbeispiele
Vortrag auf dem 3. NIRS-Food-Symposium, 04. Juli 2000, Bonn
- [25] Schmidt A.
Quantitative Analysis of the Components in Headache Tablets by NIRS
Bruker Report 142 (1996) 12-14
- [26] Schütz U.
Nahinfrarotspektroskopie: Eine neue Methode im Europäischen Arzneibuch
Dissertation, Würzburg, 1996
- [27] Göttges D.
NIR-spektrometrische Analysen an Ölsaaten, Pressgut und Rohölen innerhalb der Pflanzenöl-Gewinnung
Vortrag auf dem 3. NIRS-Food-Symposium, 04. Juli 2000, Bonn
- [28] Preun J.
NIR-spektrometrische Eigelb- und Alkoholkontrolle an Zwischen- und Endprodukten der Eierlikörproduktion;
Leistungs- und Kostenvergleich zur konventionellen Analyse
Vortrag auf dem 2. NIRS-Food-Symposium, 23. Juni 1999, Bonn
- [29] Schulz H. ; Drews H.-H. ; Quilitzsch R. ; Krüger H.
Application of NIRS for the quantification of quality parameters in selected vegetables and essential oil plants
J. Near Infrared Spectrosc. 6 (1998) 125-130
- [30] Schulz H.
Bestimmung wertgebender Minorbestandteile in Aromapflanzen mittels NIRS
SÖFW-Journal, 124 (1998) 554

- [31] Schulz H. ; Lösing G.
Anwendung der nahen Infrarotspektroskopie bei der Qualitätskontrolle ätherischer Öle
Deutsche Lebensmittelrundschau 91 (1995) 239-242
- [32] Schulz H.
Qualitätsbewertung von Arzneidrogen
Unterlagen zum Seminar „Einsatzmöglichkeiten der NIRS in der Herstellung und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln“ veranstaltet vom Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH
am 07./08. Dezember 1999 in Bad Neuenahr
- [33] Büning-Pfaue H. ; Hartmann R. ; Kehraus S. ; Urban C.
NIR- spektrometrische Untersuchungen an Lebensmitteln
Analytiker Taschenbuch 18
Springer Verlag, Berlin (1998) 181-223
- [34] Hartmann R.
Dissertation, Universität Bonn, 1997
- [35] Hildrum K.I.; Isaksson T.; Naes T.; Nilsen B.N.; Rodbotten M.; Lea P.
Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of sensory properties of beef
J. Near Infrared Spectroscopy 3 (1995) 81-87
- [36] Urban C.
Untersuchung zur Anwendbarkeit der NIRS für die Analyse von Lebensmitteln am Beispiel von Fleischerzeugnissen und zubereiteten Mahlzeiten
Dissertation, Universität Bonn, 1996
- [37] Janosch J.
Nahinfrarotsspektroskopie in der pharmazeutischen Analytik
Dissertation, Würzburg, 1993
- [38] Rücker G. ; Neugebauer M.; Willems G.G.
Instrumentelle pharmazeutische Analytik
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992
- [39] Günzler H.
IR-Spektroskopie
VCH, Weinheim, 1990
- [40] Hesse M. ; Meier H. ; Zeeh B.
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995
- [41] Fischer A.
NIR-Reflexionsspektroskopie
Deutsche Apothekerzeitung 129 (1989) 1039-1042
- [42] Hartke K.; Mutschler E. (Hrsg.)
DAB 9, Kommentar
Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1987
- [43] Ploss H.-J.
Quantitative Analytik von Suppositorien mittels Nahinfrarot-Reflexionsspektroskopie
Dissertation, Würzburg, 1996
- [44] Molt K.
Grundlagen und Anwendungen der modernen NIR-Spektrometrie, Teil I
GIT Laborzeitschrift 2 (1992) 107-113
- [45] Molt K.
Grundlagen und Anwendungen der modernen NIR-Spektrometrie, Teil II
GIT Laborzeitschrift 36 (1992) 353-362

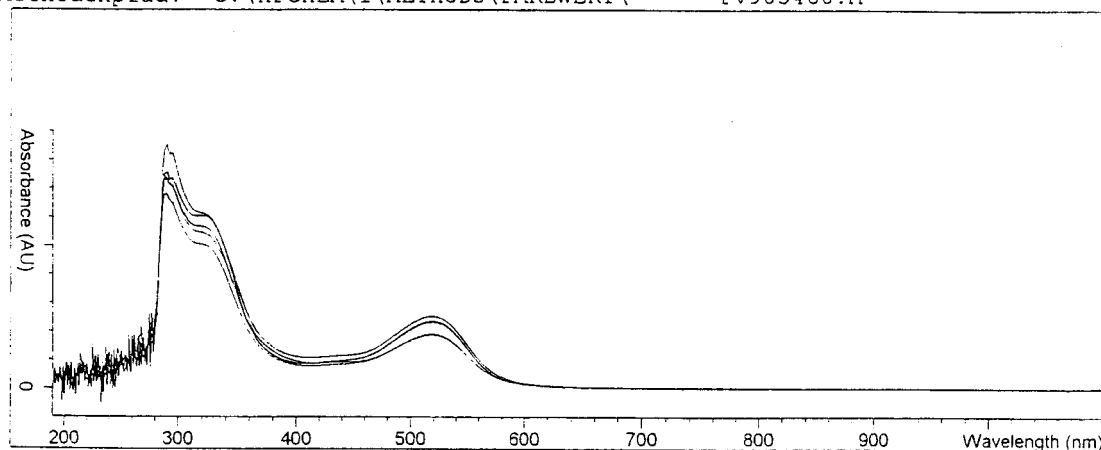
-
- [46] Griffiths P. R.; de Haseth J.
Fourier Transform Infrared Spectrometry
John Wiley & Sons, New York, 1986
- [47] Harten H.-U.
Physik für Mediziner
Springer Verlag, Berlin, 1999
- [48] Tipler P.A.
Physik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998
- [49] Bergmann L.; Schäfer C.
Lehrbuch der Experimentalphysik, Band III, Optik
Walter de Gruyter, Berlin, 1978
- [50] Herres W. ; Gronholz J.
Datenverarbeitung in der FT-IR-Spektroskopie, Teil 1
Comp. Anw. Lab. 5 (1984) 352-356
- [51] Herres W. ; Gronholz J.
Datenverarbeitung in der FT-IR-Spektroskopie, Teil 2
Comp. Anw. Lab. 6 (1984) 418-425
- [52] Herres W. ; Gronholz J.
Datenverarbeitung in der FT-IR-Spektroskopie, Teil 3
Comp. Anw. Lab. 5 (1985) 230-240
- [53] Martens H. ; Naes T.
Multivariate Calibration
J. Wiley & Sons, New York 1989
- [54] Beebe K. ; Kowalski B.
An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis
Anal. Chem. 59 (1987) 1007A-1017A
- [55] Conzen J. P.
Multivariate Kalibration
Bruker Optik Leitfaden, Karlsruhe, 2000
- [56] Geladi P. ; Kowalski B.
Partial least squares regression: a tutorial
Anal. Chim. Acta 185 (1986) 1-17
- [57] Multivariate Kalibration, 2. Auflage
Skript zur Spektroskopiesoftware OPUS
Bruker Analytik GmbH, 1998
- [58] Conzen J. P.
Methodenvalidierung in der quantitativen NIR-Spektroskopie
GIT Laborzeitschrift 42 (1998) 97-102
- [59] Handbücher zur OPUS Spektroskopiesoftware
Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Karlsruhe, 1991
- [60] Gottwald W.
Statistik für Anwender
Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- [61] Molt K.
NIR-Spektrometrie
GIT Laborzeitschrift 42 (1998) 386-387

-
- [62] Davies B. P.; Schmidt A. ; Schulzki G.
NIRS for the Determination of low caffeine content in black tea
Bruker Report 146 (1998) 10-13
- [63] Altenschmitt, W.
PhytoLab-interne Korrespondenz, 2000
- [64] Wegent A.
Wissenschaftliche Abschlussarbeit
TU Braunschweig, 1998
- [65] Gil M.I.; Holcroft D.M.; Kader A.A.
Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments
J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 1662-1667
- [66] Prüfvorschrift HPLC, PhytoLab intern, zur Coffeinbestimmung, 1997
- [67] Prüfvorschrift HPLC, PhytoLab intern, zur Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure, 1999

7 Anhang

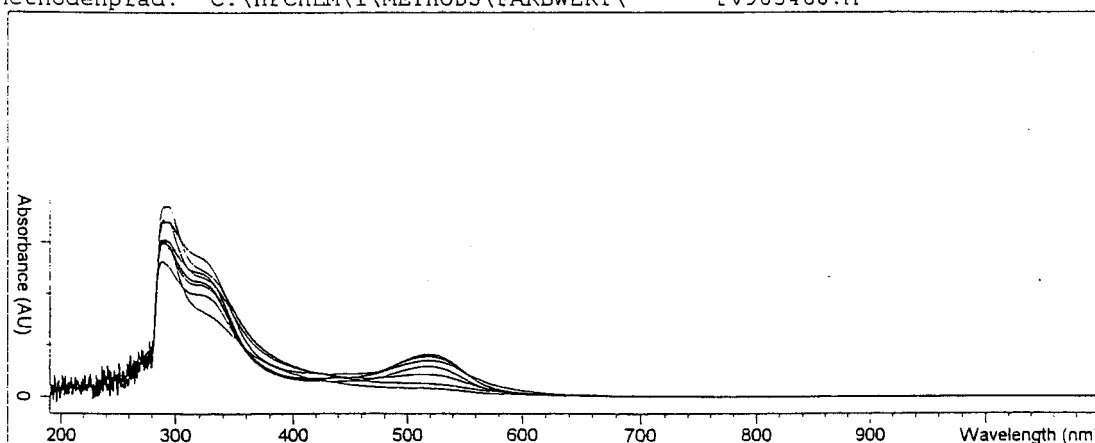
Anhang I: Spektren der Färbevermögen-Bestimmung in Hibiscusdrogen; UV/Vis-Spektrometer

PHYTOLAB GmbH & Co. KG 91487 Vestenbergsgreuth
Messreport Datum: 05/18/2000 Uhrzeit:02:49:41 Seite 1 von 1
Benutzer: Margit Fink
Datenpfad: C:\HPCHEM\1\DATA\SESQUI~1\ 180500.SD
Methodenpfad: C:\HPCHEM\1\METHODS\FARBWERT\ PV903460.M



Method Information:
PHYTOLAB-PV 903460 Färbevermögen von Hibiscusblüten n. DAB 1997

PHYTOLAB GmbH & Co. KG 91487 Vestenbergsgreuth
Messreport Datum: 03/31/2000 Uhrzeit:10:23:19 Seite 1 von 2
Benutzer: Margit Fink
Datenpfad: C:\HPCHEM\1\DATA\FARBWERT\ MF2903-2.SD
Methodenpfad: C:\HPCHEM\1\METHODS\FARBWERT\ PV903460.M



Method Information:
PHYTOLAB-PV 903460 Färbevermögen von Hibiscusblüten n. DAB 1997

Anhang II: Spektrum Grüntee-Droge; Bestimmung der Flavanole, Coffein, Theobromin, Theogallin und Gallussäure in Grünteedrogen mittels HPLC

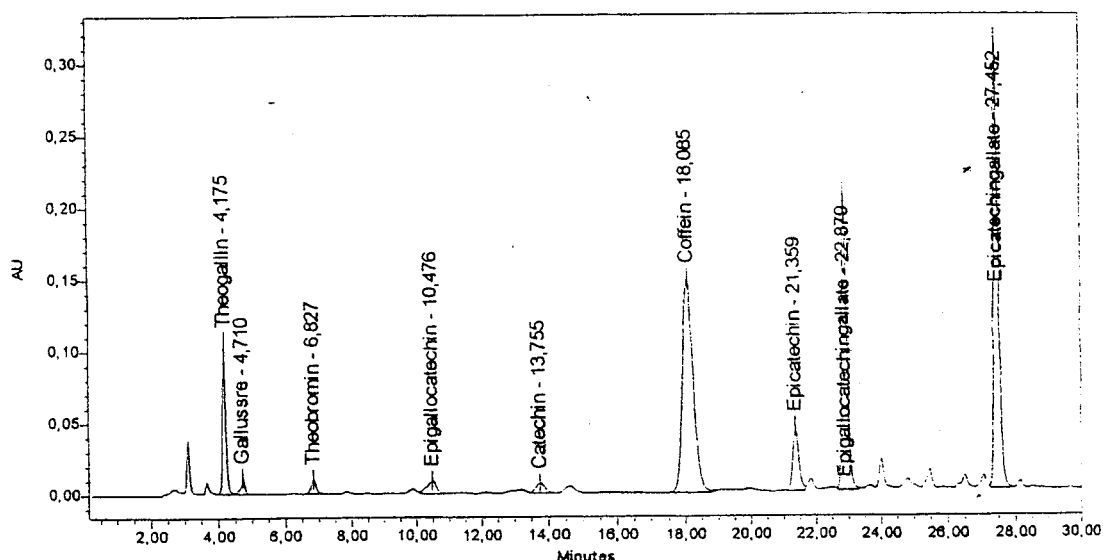
Project Name Gerbstoffe_NR
User Name finkm
Current Date 27.08.99

PhytoLab Report

Anteil an : Gerbstoffen
Sample Name GT Droge
Kunde
Ch.B.:
PL-Unters.Nr. 9100386
Vial 60
Injection 1
Calibration Id 3701

Channel 278 nm
Channel Description PDA 278,0 nm
Run Time 55,00 Minutes
Date Acquired 03.08.99 17:13:48
Acquired By finkm
Date Processed 27.08.99 12:14:31
Processed By finkm
Sample Weight 0,1981
Dilution 5,0000

HPLC Chromatogram



Component Results

	Name	RT	Area	Fläche durch Einwaage	Konz.i.d.Loesung	Units	Gehalt	Einheit
1	Theogallin	4,175	710745	3587809,5183				mg/g
2	Gallussäure	4,710	105430	532207,2808	0,4075	mg/100ml	1,0285	mg/g
3	Theobromin	6,827	120800	608781,3005	0,5537	mg/100ml	1,3974	mg/g
4	Epigallocatechin	10,476	191621	967296,3636	10,4837	mg/100ml	26,4605	mg/g
5	Catechin	13,755	138190	697577,3310	2,3422	mg/100ml	5,9118	mg/g
6	Coffein	18,085	3355952	16940897,8806	14,2933	mg/100ml	36,0781	mg/g
7	Epicatechin	21,359	591178	2984241,9140	9,0288	mg/100ml	22,7836	mg/g
8	Epigallocatechingallate	22,879	2326233	11742718,4472	20,2209	mg/100ml	51,0370	mg/g
9	Epicatechingallate	27,452	3059084	15442117,9841	22,7286	mg/100ml	57,3685	mg/g